



HAL
open science

**ÉTUDE NEUROCHIMIQUE ET
COMPORTEMENTALE DES MODULATIONS
INDUITES PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE
TYPE δ SUR LES LIBÉRATIONS STRIATALES DE
GLUTAMATE ET DE DOPAMINE CHEZ LE RAT**

Fabrice Billet

► **To cite this version:**

Fabrice Billet. ÉTUDE NEUROCHIMIQUE ET COMPORTEMENTALE DES MODULATIONS INDUITES PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ SUR LES LIBÉRATIONS STRIATALES DE GLUTAMATE ET DE DOPAMINE CHEZ LE RAT. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Rouen, 2007. Français. NNT : . tel-00274404

HAL Id: tel-00274404

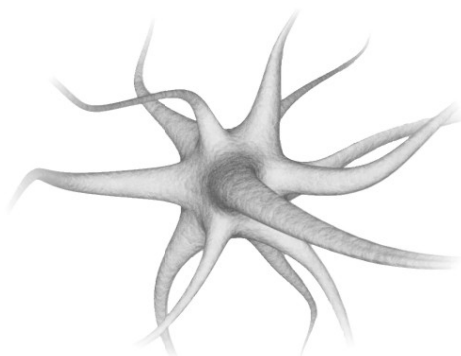
<https://theses.hal.science/tel-00274404>

Submitted on 18 Apr 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE ROUEN
ÉCOLE DOCTORALE NORMANDE CHIMIE-BIOLOGIE
SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES



Fabrice Billet

**ÉTUDE NEUROCHIMIQUE ET COMPORTEMENTALE DES
MODULATIONS INDUITES PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE
TYPE δ SUR LES LIBÉRATIONS STRIATALES DE GLUTAMATE ET DE
DOPAMINE CHEZ LE RAT**

Soutenu le 10 décembre 2007

Devant le jury composé de

Dr Valérie DAUGÉ, Rapporteur
Pr Alain GARDIER, Rapporteur
Dr Nathalie DOURMAP, Examineur
Pr Jean COSTENTIN, Directeur de Thèse



« Singulière faiblesse de nos facultés d'observation qui fait que nous ne voyons pas les choses cependant parfaitement visibles sans le concours d'une adaptation particulière de notre esprit. Une fois la chose vue, et bien vue, il est facile d'apprendre aux autres à la voir à leur tour. Mais le tout est de la voir une première fois... »



Jean-Martin Charcot
(29 novembre 1825 - 16 août 1893)
Père de la neurologie moderne

« Si la préhistoire a précédé l'histoire, il n'a jamais été démontré que la prescience ait précédé la science. »



André Isaac dit Pierre Dac
(15 août 1893 - 9 février 1975)
Humoriste

À Monsieur le Professeur Jean COSTENTIN,

Ce stage a été effectué dans le laboratoire que vous dirigez. Je vous remercie vivement de m'avoir offert cette opportunité et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Votre érudition m'a largement influencé au cours de ces dernières années et elle restera, sans le moindre doute, un modèle pour celles à venir. Pour toutes ces raisons, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

À Madame le Docteur Valérie DAUGÉ,

Vous avez accepté de vous plonger dans la lecture critique de ce manuscrit. J'en suis particulièrement honoré et je tiens sincèrement à vous en remercier.

À Madame le Docteur Nathalie DOURMAP,

Rien de ce travail n'aurait été possible si tu ne m'avais initié à la recherche et tes qualités, tant humaines que scientifiques, ont largement contribué à son aboutissement. La disponibilité et l'amabilité dont tu as fait preuve quotidiennement ont notamment été exemplaires et je t'en remercie sincèrement.

À Monsieur le Professeur ALAIN GARDIER,

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury en tant que rapporteur. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Lionel Cazin pour avoir accepté de remplir les fonctions de tuteur dans le cadre de mon Monitorat et grâce auquel j'ai ainsi pu m'initier à l'enseignement supérieur. Dans ce même contexte, les conseils de Monsieur le Docteur Marek Lamacz ont également été particulièrement avisés. Je garde un excellent souvenir de la sympathie dont vous avez tous deux fait preuve à mon égard et je tiens ici à vous le témoigner.

Il m'importe également de remercier tout particulièrement Jean-Claude (Monsieur le Docteur Do Rego) pour tout le temps qu'il m'a accordé, au détriment du sien, et pour m'avoir initié aux techniques de capture synaptosomale et de radiolisation. Je remercie, de plus, Lionel Vaudreuil pour sa contribution à la mise en place du protocole des « dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien ». Je n'oublie pas, par ailleurs, les autres membres du laboratoire que je remercie également pour leurs nombreux conseils et pour leur sympathie.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux, famille et amis, qui m'ont soutenu tout au long de ces années, notamment au cours de la période difficile où j'ai dû concilier l'achèvement de ce travail avec une activité salariée dans le secteur privé.

Je dédie ce travail

À ma maman,

À Carine, ma compagne,

Ainsi qu'à mes frères et amis.

SOMMAIRE

<i>LISTE DES ABRÉVIATIONS</i>	21
<i>AVANT-PROPOS</i>	25
1. INTRODUCTION	29
1.1.1 LE STRIATUM	33
1.1.1.1 LES NEURONES STRIATAUX	35
1.1.1.2 LES AFFÉRENCES STRIATALES	39
1.1.1.3 LES EFFÉRENCES STRIATALES.....	46
1.1.2 LES GANGLIONS DE LA BASE.....	49
1.1.2.1 DESCRIPTION DU MODÈLE ANATOMO-FONCTIONNEL CLASSIQUE.....	50
1.1.2.2 REMISE EN CAUSE DE CE MODÈLE	53
1.2 SYSTÈMES DE NEUROTRANSMISSION ET DE NEUROMODULATION	
ÉTUDIÉS	56
1.2.1 LE GLUTAMATE.....	56
1.2.1.1 BIOSYNTHÈSE ET DÉGRADATION	58
1.2.1.2 STOCKAGE VÉSICULAIRE ET LIBÉRATION	60
1.2.1.3 RECAPTURE.....	62
1.2.1.4 RÉCEPTEURS ET MÉCANISMES DE TRANSDUCTION	66
1.2.2 LA DOPAMINE	76
1.2.2.1 BIOSYNTHÈSE.....	78
1.2.2.2 STOCKAGE VÉSICULAIRE ET LIBÉRATION	80
1.2.2.3 RECAPTURE ET DÉGRADATION	83
1.2.2.4 RÉCEPTEURS ET MÉCANISMES DE TRANSDUCTION	85
1.2.3 LES ENKÉPHALINES.....	88
1.2.3.1 BIOSYNTHÈSE ET DÉGRADATION	90
1.2.3.2 RÉCEPTEURS ET MÉCANISMES DE TRANSDUCTION	93
1.3 MALADIE DE PARKINSON ET DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA	99
1.3.1 LA MALADIE DE PARKINSON	100
1.3.1.1 ASPECTS CLINIQUES ET ANATOMO-PATHOLOGIQUES.....	102
1.3.1.2 ÉTIOLOGIE	108

1.3.1.3	APPROCHES THÉRAPEUTIQUES	115
1.3.2	LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA	125
1.3.2.1	PHÉNOMÉNOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA	126
1.3.2.2	MODÈLES EXPÉRIMENTAUX.....	130
1.3.2.3	BASES NEUROCHIMIQUES EXPÉRIMENTALES	139
1.3.2.3.1	HYPOTHÈSE DOPAMINERGIQUE	139
1.3.2.3.2	HYPOTHÈSE GLUTAMATERGIQUE	142
1.3.2.3.3	AUTRES HYPOTHÈSES.....	144
2.	<i>BUT DU TRAVAIL</i>	147
3.	<i>MATÉRIELS ET MÉTHODES</i>	153
3.1	ANIMAUX	155
3.2	CHIRURGIE	155
3.2.1	LÉSIONS CORTICALES.....	155
3.2.2	INJECTION INTRA-STRIATALE D'ACIDE L- α -AMINOADIPIQUE.....	156
3.2.3	INJECTION D'HYDROXY-6-DOPAMINE DANS LE FAISCEAU MÉDIAN DU TÉLENCÉPHALE	156
3.2.4	IMPLANTATION D'UNE CANULE-GUIDE POUR LES INJECTIONS INTRACÉRÉBROVENTRICULAIRES	157
3.2.5	IMPLANTATION D'UNE CANULE-GUIDE POUR LES EXPÉRIENCES DE MICRODIALYSE.....	157
3.3	EXPÉRIENCES DE MICRODIALYSE	158
3.4	PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LA DÉTERMINATION DE LEUR CONTENU EN NEUROTRANSMETTEURS	159
3.4.1	DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS DE DOPAMINE ET DE DOPAC.....	160
3.4.2	DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS DE GLUTAMATE	161
3.5	DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ GLUTAMINE SYNTHÉTASE	162

3.6	MESURE DE LA CAPTURE SYNAPTOSOMALE DE GLUTAMATE ET DE DOPAMINE	163
3.7	MESURE DE LA DENSITÉ DES SITES DE LIAISON DE LA [³H]-DPDPE SUR MEMBRANES STRIATALES.....	164
3.8	RÉALISATION ET COLORATION DE COUPES HISTOLOGIQUES AU CRÉSYL VIOLET	165
3.9	ÉPREUVE DES ROTATIONS INDUITES PAR L'AMPHÉTAMINE OU L'APOMORPHINE.....	166
3.10	ÉTUDE DES MOUVEMENTS INVOLONTAIRES ANORMAUX.....	167
3.11	ORIGINE DES SUBSTANCES UTILISÉES ET PRÉPARATION DES SOLUTIONS	171
3.12	ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS	172
4.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	173
4.1	RÔLE DES NEURONES CORTICO-STRIATAUX DANS LA LIBÉRATION STRIALE DE DOPAMINE INDUITE PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ	177
4.1.1	CHOIX DU MODÈLE LÉSIONNEL ET INFLUENCE DE LA LÉSION CORTICALE SUR LES CARACTÉRISTIQUES ANATOMIQUES ET NEUROCHIMIQUES DU STRIATUM	178
4.1.1.1	ÉVALUATION SUR COUPES STRIATALES COLORÉES AU CRÉSYL VIOLET DE L'ÉTENDUE DE LA LÉSION PRODUITE PAR THERMO-COAGULATION DU CORTEX.....	178
4.1.1.2	EFFET DE LA LÉSION CORTICALE SUR LA TRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE STRIALE.....	180
4.1.1.3	EFFET DE LA LÉSION CORTICALE SUR LA TRANSMISSION DOPAMINERGIQUE STRIALE	185
4.1.2	ÉVALUATION PAR MICRODIALYSE INTRA-STRIATALE DE L'EFFET D'UNE INFUSION DE DPDPE SUR LES CONCENTRATIONS BASALES DE DOPAMINE ET DE	

GLUTAMATE CHEZ DES ANIMAUX SOUMIS OU NON À UNE LÉSION DU CORTEX

IPSILATÉRAL.....	187
4.1.2.1 EFFETS DE L'INFUSION DE LA TTX ET D'UN MILIEU DÉPOURVU DE CALCIUM SUR LES CONCENTRATIONS EXTRACELLULAIRES BASALES DE DOPAMINE.....	188
4.1.2.2 EFFETS DE L'INFUSION DE LA TTX ET D'UN MILLIEU DÉPOURVU DE CALCIUM SUR LES CONCENTRATIONS EXTRACELLULAIRES BASALES DE GLUTAMATE.....	191
4.1.2.3 EFFET D'UNE INFUSION STRIATALE DE DPDPE SUR LA CONCENTRATION DE DOPAMINE DANS LES DIALYSATS OBTENUS PAR MICRODIALYSE À PARTIR DU STRIATUM D'ANIMAUX SOUMIS OU NON À UNE LÉSION DU CORTEX IPSILATÉRAL ...	194
4.1.2.4 EFFET D'UNE INFUSION STRIATALE DE DPDPE SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE DANS LES DIALYSATS OBTENUS PAR MICRODIALYSE À PARTIR DU STRIATUM D'ANIMAUX SOUMIS OU NON À UNE LÉSION DU CORTEX IPSILATÉRAL....	199
4.1.3 EFFET DE LA LÉSION CORTICALE SUR LA LIAISON DE [³ H]-DPDPE À UNE SUSPENSION DE MEMBRANES PRÉPARÉE À PARTIR DU STRIATUM IPSILATÉRAL	204

4.2 RÔLE DES CELLULES GLIALES DANS LES LIBÉRATIONS STRIATALES DE GLUTAMATE ET DOPAMINE INDUITES PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE

TYPE δ.....	211
4.2.1 EFFETS PRÉCOCES D'UNE ADMINISTRATION D'ACIDE L- α -AMINOADIPIQUE DANS LE STRIATUM.....	214
4.2.2 EFFET D'UNE CO-INFUSION STRIATALE DE DPDPE ET DE L- α AA SUR LES TAUX EXTRACELLULAIRES DE GLUTAMATE.....	218
4.2.3 EFFET D'UNE CO-INFUSION STRIATALE DE DPDPE ET DE L- α AA SUR LES CONCENTRATIONS EXTRACELLULAIRES DE DOPAMINE.....	221
4.2.4 MODIFICATIONS NEUROCHIMIQUES INDUITES DANS LE STRIATUM DEUX JOURS APRÈS INJECTION DE L- α AA	223
4.2.5 EFFET D'UNE INFUSION INTRA-STRIATALE DE DPDPE SUR LES TAUX EXTRACELLULAIRES DE GLUTAMATE DEUX JOURS APRÈS INJECTION DE L- α AA	227
4.2.5.1 MILIEU DÉPOURVU DE GLUTAMINE.....	227
4.2.5.2 MILIEU ENRICHI EN GLUTAMINE	232

4.2.6	EFFET D'UNE INFUSION INTRA-STRIATALE DE DPDPE SUR LES TAUX EXTRACELLULAIRES DE DOPAMINE DEUX JOURS APRÈS INJECTION DE L- α AA	236
4.2.6.1	MILIEU DÉPOURVU DE GLUTAMINE.....	236
4.2.6.2	MILIEU ENRICHÉ EN GLUTAMINE	238
4.2.7	EFFETS DE LA DPDPE SUR LES TAUX EXTRACELLULAIRES DE GLUTAMATE ÉVALUÉS EN PRÉSENCE D'UN INHIBITEUR SÉLECTIF DE LA CAPTURE DE GLUTAMATE ET SUR LA CAPTURE SYNAPTOSOMALE DE [3 H]-L-GLUTAMATE	242
4.3	RÔLE DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ DANS LES MOUVEMENTS DYSKINÉTIQUES INDUITS PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT « HÉMI-PARKINSONNIEN »	249
4.3.1	VALIDATION DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL DE LÉSION DU FAISCEAU MÉDIAN DU TÉLÉNCÉPHALE PAR INJECTION D'HYDROXY-6-DOPAMINE.....	251
4.3.1.1	ANALYSE NEUROCHIMIQUE DE L'AMPLEUR DE LA LÉSION AU NIVEAU STRIATAL.....	252
4.3.1.2	ÉPREUVES COMPORTEMENTALES DES ROTATIONS INDUITES PAR L'AMPHÉTAMINE ET L'APOMORPHINE.....	256
4.3.2	ÉTUDE DES DYSKINÉSIES INDUITES PAR L'ADMINISTRATION CHRONIQUE DE L-DOPA CHEZ DES ANIMAUX PRÉALABLEMENT LÉSÉS PAR INJECTION UNILATÉRALE DE 6-OHDA DANS LE MFB	259
4.3.2.1	CARACTÉRISTIQUES COMPORTEMENTALES DES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONNIEN	260
4.3.2.2	CARACTÉRISTIQUES NEUROCHIMIQUES DES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONNIEN.....	264
4.3.3	RÔLE DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ DANS LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONNIEN	271
4.3.3.1	EFFETS D'UNE ADMINISTRATION <i>I.C.V.</i> DE DPDPE OU DE NALTRINDOLE SUR LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONNIEN.....	272
4.3.3.2	ÉVALUATION DE LA LIAISON STRIATALE DE [3 H]-DPDPE CHEZ DES ANIMAUX HÉMI-PARKINSONNIENS EXPRIMANT OU NON DES DYSKINÉSIES EN RÉPONSE AU TRAITEMENT PAR LA L-DOPA	274

4.4	RÔLE DES NEURONES CORTICO-STRIATAUX DANS LA MODULATION EXERCÉE PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ SUR LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONNIEN	279
4.4.1.1	EFFETS DE LA LÉSION DU CORTEX IPSILATÉRAL SUR LES PARAMÈTRES NEUROCHIMIQUES ÉVALUÉS DANS LE STRIATUM DU RAT HÉMI-PARKINSONNIEN TRAITÉ PAR LA L-DOPA	280
4.4.1.2	EFFETS D'UNE ADMINISTRATION <i>I.C.V.</i> DE DPDPE SUR LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONNIEN SOUMIS OU NON À UNE LÉSION DES NEURONES CORTICO-STRIATAUX	284
4.4.1.3	ÉVALUATION DE LA LIAISON STRIATALE DE [³ H]-DPDPE CHEZ DES ANIMAUX HÉMI-PARKINSONNIENS AYANT OU NON SUBI UNE LÉSION DES NEURONES CORTICO-STRIATAUX ET EXPRIMANT OU NON DES DYSKINÉSIES EN RÉPONSE AU TRAITEMENT PAR LA L-DOPA.....	285
5.	<i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	291
6.	<i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>.....	299
	<i>ANNEXES</i>	345
	<i>TABLE DES ILLUSTRATIONS</i>	347
	<i>PUBLICATIONS</i>	353

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **3-MT** : 3-méthoxytyramine
- **3-PGK** : 3-phosphoglycérate kinase
- **6-OHDA** : hydroxy-6-dopamine
- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **ADNc** : ADN complémentaire
- **ADP** : adénosine diphosphate
- **AMPA** : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate
- **AMPc** : adénosine monophosphate cyclique
- **ANOVA** : Analyse de variance
- **APN** : aminopeptidase N
- **ARNm** : acide ribonucléique messenger
- **ATP** : adénosine triphosphate
- **ATV** : aire tegmentale ventrale
- **COMT** : catéchol-O-méthyl transférase
- **CPP** : 3-[(\pm)-2-carboxypiperazine-4-yl]-propionyl-1-phosphonate
- **DADLE** : [D-Ala², D-Leu]-enképhaline
- **DAG** : diacylglycérol
- **Del-II** : [D-Ala²]-deltorphine II
- **DID** : dyskinésies de pic de dose, pour « *drug-induced dyskinesia* » (= LID)
- **DOPA** : dihydroxy-3,4-phénylamine
- **DOPAC** : acide 3,4-dihydroxyphénylacétique
- **DPDPE** : [D-Pen²,D-Pen⁵]-enképhaline
- **DSLET** : [D-Ser²,Leu⁵,Thr⁶]-enképhaline
- **EP** : noyau entopédonculaire
- **GABA** : acide gamma-amino butyrique
- **GAPDH** : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
- **GDNF** : « *glial cell line-derived neurotrophic factor* »
- **GFAP** : « *Glial Fibrillary Acidic Protein* »
- **GPe** : globus pallidus externe
- **GPi** : globus pallidus interne
- **GS** : glutamine synthétase
- **HPLC** : chromatographie liquide haute performance
- **HVA** : acide homovanillique
- **i.c.v.** : intracérébroventriculaire
- **i.p.** : intrapéritonéale
- **IMAO** : inhibiteur des monoamines oxydases
- **IP₃** : inositol-1,4,5-triphosphate
- **KA** : acide kaïnique

-
- **LID** : dyskinésies du pic de dose, pour « *L-DOPA-induced dyskinesia* » en anglais (= DID)
 - **LPT** : potentialisation à long terme, pour l'anglais « *long term potentiation* »
 - **L- α AA** : acide L- α -aminoadipique
 - **MAO** : monoamine oxydase
 - **MAP-kinase** : « *mitogen-activated protein kinase* »
 - **MFB** : faisceau médian du télencéphale, pour « *medial forebrain bundle* » en anglais
 - **MPP⁺** : 1-méthyl-4-phénylpyridinium
 - **MPPP** : 1-méthyl-4-phényl-4-propionoxy- pipéridine
 - **MPTP** : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydro-pyridine
 - **MSO** : L-méthionine sulfoximine
 - **NAD** : nicotinamide adénine dinucléotide
 - **NEP** : endopeptidase neutre, encore appelée néprilysine (EC3.4.21.11)
 - **NMDA** : N-méthyl-D-aspartate
 - **NST** : noyau sous-thalamique
 - **PAG** : glutaminase activée par le phosphate, de l'anglais « *phosphate-activated glutaminase* »
 - **PDC** : acide L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylique
 - **PKC** : protéine kinase de type C
 - **PLC** : phospholipase de type C
 - **PPE-A** : préproenképhaline A
 - **PPE-B** : préproenképhaline B
 - **PPSE** : potentiel post-synaptique excitateur
 - **RCPG** : récepteurs couplés aux protéines de type G
 - **RMN** : résonance magnétique nucléaire
 - **SHF** : stimulation à haute fréquence
 - **SNc** : substance noire pars compacta
 - **SNr** : substance noire pars reticulata
 - **TBOA** : *thréo*- β -benzyloxyaspartate
 - **TEP** : tomographie par émission de positons
 - **TTX** : tétrodotoxine
 - **X_c⁻** : échangeur cystine-glutamate

AVANT-PROPOS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été en partie financés par le *Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Formation*.

Ils ont été réalisés au sein de l'unité de :

Neuropsychopharmacologie Expérimentale

- CNRS FRE 2735 - IFRMP 23 -

- Institut Hospitalo-Universitaire de Recherche Biomédicale -

Faculté de Médecine et de Pharmacie

22, Boulevard Gambetta

76183 Rouen CEDEX

Ils ont, par ailleurs, fait l'objet des publications suivantes :

- Billet F., Dourmap N. & Costentin J. (2004) Involvement of corticostriatal glutamatergic terminals in striatal dopamine release elicited by stimulation of delta-opioid receptors. *Eur J Neurosci*, 20, 2629-2638.
- Billet F., Costentin J. & Dourmap N. (2007) Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal δ -opioid receptors. *Neuroscience*, doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.004. *In Press*.
- Billet F., Vaudreuil L., Costentin J. & Dourmap N. « Influence of δ - opioid receptors located on cortico-striatal terminals in dyskinesia induced by L-DOPA in hemiparkinsonian rats ». *En préparation*.

ÉTUDE NEUROCHIMIQUE ET COMPORTEMENTALE DES MODULATIONS INDUITES PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ SUR LES LIBÉRATIONS STRIATALES DE GLUTAMATE ET DE DOPAMINE CHEZ LE RAT

Les enképhalines, ligands endogènes des récepteurs opioïdes δ , sont les neuropeptides les plus abondants du striatum, structure où elles stimulent la libération de dopamine. L'influence des récepteurs δ sur la transmission glutamatergique striatale, principalement supportée par les neurones corticaux, est en revanche méconnue. Néanmoins, des données suggèrent son implication dans la libération de dopamine induite par la DPDPE, agoniste sélectif des récepteurs δ . Nous avons exploré cette hypothèse chez le Rat. Dans ce but, nous avons étudié les effets de la DPDPE sur les taux extracellulaires de dopamine et de glutamate après lésion du cortex ipsilatéral. Nos résultats montrent que la libération striatale de dopamine induite par la DPDPE est la conséquence d'une libération de glutamate par les terminaisons cortico-striatales. Nous avons ensuite recherché une éventuelle contribution des cellules gliales à ce processus. Nos expériences indiquent que, bien qu'essentielles à l'homéostasie du glutamate, les cellules gliales ne participent pas aux effets stimulants de la DPDPE sur les taux de glutamate et de dopamine. Nous avons enfin étudié l'implication comportementale de ces interactions, grâce au modèle des dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat hémiparkinsonien. Nos résultats montrent que les récepteurs δ portés par les terminaisons cortico-striatales sont impliqués dans ces dyskinésies. Nos travaux permettent ainsi d'élargir la connaissance des interactions entre les principaux systèmes de transmission du striatum. Ils confèrent également aux antagonistes des récepteurs δ d'intéressantes perspectives dans l'amélioration du traitement de la maladie de Parkinson.

Mots clés : *récepteurs opioïdes δ ; libération de glutamate ; libération de dopamine ; striatum ; microdialyse ; dyskinésies induites par la L-DOPA.*

NEUROCHEMICAL AND BEHAVIORAL STUDY OF MODULATIONS INDUCED BY δ OPIOÏD RECEPTORS ON GLUTAMATE AND DOPAMINE RELEASE IN THE RAT STRIATUM

Enkephalins, endogenous ligands of δ opioïd receptors, are the most abundant neuropeptides in the striatum, structure in which they stimulate dopamine release. However, the effect of δ opioïd receptors on striatal glutamate, which is mainly released by cortico-striatal neurons, is unknown. Nevertheless, some data suggest its involvement in the dopamine release induced by DPDPE, a δ opioïd selective agonist. This hypothesis was tested in the rat. For this purpose, we studied the effect of DPDPE on extracellular dopamine and glutamate levels in the striatum of animals submitted to an ipsilateral cortical lesion. Our results indicate that the striatal dopamine release induced by DPDPE is a consequence of glutamate release from cortico-striatal terminals. Then, we studied the contribution of glial cells in this process. Our experiments show that, although glial cells are essential to maintain glutamatergic neurotransmission, they are not directly involved in the stimulant effect induced by DPDPE on glutamate and dopamine extracellular levels. At last, we investigated the behavioral significance of these interactions, using the rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. Our results indicate that δ opioïd receptors located on cortico-striatal terminals are involved in dyskinesia. Taken together, our data enhance the knowledge of interactions between the main striatal neurotransmission and neuromodulation systems. They also confer on δ opioïd antagonists interesting properties in the improvement of Parkinson's disease therapy.

Keywords: *δ opioïd receptors; glutamate release; dopamine release; striatum; microdialysis; L-DOPA-induced dyskinesia.*

1. INTRODUCTION

Les plus anciens écrits témoignant d'un intérêt de l'Homme pour son cerveau ont été retrouvés sur des papyrus égyptiens dont l'origine est estimée à près de 1700 ans avant notre ère. Il fallut cependant attendre la fin du XIX^e siècle pour que le voile sous lequel se dérobait jusqu'alors la compréhension de son fonctionnement commence à être levé. La contribution des travaux menés à partir des années 1860, à l'hôpital parisien de la Salpêtrière, par Jean-Martin Charcot, aujourd'hui considéré comme le père de la neurologie moderne, y est fondamentale. Le concept des lésions cérébrales, que Paul Broca concourut simultanément à faire émerger, s'est notamment révélé d'une extraordinaire fécondité pour structurer une partie des maladies du système nerveux central et comprendre certains aspects de sa physiologie et de sa pathologie. Deux décennies plus tard, vers 1890, Santiago Ramón y Cajal découvre l'existence de cellules caractéristiques du système nerveux, les neurones, scellant ainsi les premières pierres d'une nouvelle discipline : la neurobiologie. Si de nouvelles données n'ont pas manqué d'alimenter notre connaissance au cours de la première moitié du siècle suivant, les sciences du cerveau n'ont connu un essor considérable qu'à partir des années 1950. Cette formidable expansion fut notamment caractérisée par un foisonnement de nouvelles spécialités scientifiques portant le préfixe « *neuro* » qui, dans les années 1960, finirent par être regroupées sous l'appellation unique de « *neurosciences* ».

On appréhende aujourd'hui pleinement la complexité du cerveau. Celui-ci est, en effet, constitué de près de 100 milliards de cellules nerveuses (10^{11}). On estime, de plus, que chacune de ces cellules peut former de 10 000 à 100 000 connexions avec d'autres neurones, portant ainsi le nombre total de synapses dans le cerveau humain à l'échelle du million de milliards (de 10^{15} à 10^{16}). En considérant la synapse comme unité de base, par analogie au domaine de l'informatique où l'unité d'information, le bit, correspond à deux états différents (0 ou 1, équivalent à *oui* ou *non*), le nombre total d'informations que pourrait produire un cerveau humain atteint une valeur tellement grande (2 élevé à la puissance $10^{15} =$

$2^{1\,000\,000\,000\,000\,000}$) que même le qualificatif « astronomique » apparaît insuffisant pour la décrire, puisqu'elle dépasse, de loin, l'estimation du nombre total de particules élémentaires (protons et neutrons) dans la partie actuellement observable de l'Univers (2^{950}). Par ailleurs, on dénombre à ce jour plus d'une centaine de substances différentes, neurotransmetteurs et neuromodulateurs confondus, capables de participer au dialogue synaptique. L'existence de plusieurs classes de récepteurs pour chacune de ces substances semble, en outre, constituer une règle plus qu'une exception. Enfin, le cerveau renferme également de nombreuses cellules non neuronales, en nombre environ dix fois supérieur à celui des neurones, dont les fonctions, longtemps considérées comme essentiellement cytoarchitecturales, apparaissent aujourd'hui de plus en plus importantes. Ce niveau de complexité sans égal explique en partie la place particulière qu'occupent aujourd'hui les neurosciences dans le domaine des sciences de la vie. En outre, de par leurs relations étroites avec le comportement, les sciences du cerveau dépassent les limites traditionnelles de la biologie pour s'élargir aux domaines des sciences humaines et sociales. Ces deux caractéristiques génèrent chez nos contemporains une attente diffuse, où se mêlent la crainte et l'admiration, qui confère à l'élucidation des mécanismes neurobiologiques régissant les activités émotionnelles, cognitives et motrices un statut d'enjeu scientifique majeur. En regard des zones d'ombre qui restent à explorer, l'étendue des territoires qu'éclaircissent actuellement nos connaissances reste dérisoire. Néanmoins, à mesure qu'elle progresse, nous pénétrons de plus en plus profondément au cœur du mystère de l'Homme...

1.1 ORGANISATION ANATOMO-FONCTIONNELLE DU STRIATUM ET DES GANGLIONS DE LA BASE

Les ganglions de la base représentent un ensemble de structures cérébrales sous-corticales anatomiquement interconnectées. Fonctionnellement, ces noyaux gris centraux apparaissent principalement impliqués dans le contrôle de la posture et du mouvement par intégration de diverses informations d'origine sensorielle, cognitive et motivationnelle (Parent & Hazrati, 1995a ; Mink, 1996). Le striatum, cible majeure des afférences corticales, se positionne comme la porte d'entrée du circuit interconnectant entre elles ces différentes structures.

1.1.1 LE STRIATUM

Le striatum constitue une unité fonctionnelle composée du néostriatum et du striatum ventral. Le striatum ventral regroupe le noyau accumbens et le tubercule olfactif dont certaines portions partagent avec le noyau accumbens des similitudes fonctionnelles. Le néostriatum est également composé de deux noyaux, le noyau caudé et le putamen, anatomiquement distincts chez l'Homme, mais associés chez le Rat. Chez les primates, ces deux structures sont en effet séparées par une cloison dans laquelle fusionnent le réseau cortico-fugal et la capsule interne. À l'inverse, chez les rongeurs, les fibres cortico-fugales sont dispersées et il n'existe pas de séparation entre les deux noyaux. En pratique, le terme « striatum » est généralement associé, chez le Rat, à l'unité anatomique et fonctionnelle représentée par le néostriatum alors que, chez l'Homme, on préférera utiliser l'appellation « caudé-putamen ».

D'un point de vue cytoarchitectonique, le striatum est constitué de deux compartiments neurochimiques, la matrice et les striosomes, qui se distinguent par une forte hétérogénéité liée à la présence d'une grande variété de neuropeptides, de neurotransmetteurs et d'enzymes impliqués dans le métabolisme de ces neurotransmetteurs (*pour revue* : Graybiel, 1990). Cette hétérogénéité neurochimique confère au striatum une organisation régionale dite « en

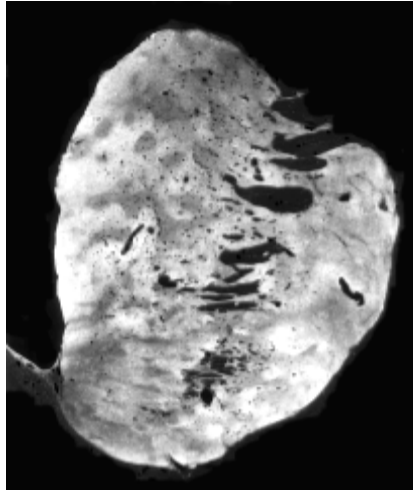


Figure 1 : Mise en évidence de la compartimentalisation du striatum à partir d'une coupe coronale de cerveau humain réalisée au niveau striatal et traitée par marquage de l'enzyme acétylcholine estérase.

La matrice extra-striosomale, riche en acétylcholine estérase, correspond aux zones sombres qui apparaissent en gris foncé. Les striosomes, contenant peu d'acétylcholine estérase, sont faiblement marqués et correspondent aux zones plus claires (d'après *Graybiel, 1990*).

mosaïque » (Figure 1). Les striosomes représentent des régions bien individualisées, riches en récepteurs opioïdes de type μ et en tyrosine hydroxylase. La matrice se caractérise en revanche par une forte activité acétylcholine estérase. La plupart des autres marqueurs neurochimiques sont plus uniformément répartis dans les striosomes et la matrice, avec toutefois une localisation préférentielle dans l'un ou l'autre de ces compartiments. D'un point de vue quantitatif, la matrice occupe plus de 85 % de la surface striatale alors que les striosomes ne représentent que 10 à 20 % de ce volume, au sein duquel ils forment un labyrinthe tridimensionnel. Cette architecture compartimentée est, par ailleurs, étroitement liée à la topographie des afférences et efférences striatales (*pour revue : Gerfen, 1992*). En effet, la matrice reçoit d'une part des afférences dopaminergiques provenant de la partie dorsale de la pars compacta de la substance noire (SNc, aire A9), de l'aire tegmentale ventrale (ATV, aire A10) et du noyau rétro-rubral (aire A8) et, d'autre part, des afférences originaires des aires corticales sensimotrices et cingulaires. Les striosomes reçoivent, quant à eux, des afférences dopaminergiques de la partie ventrale de la SNc, des îlots dopaminergiques de la

substance noire réticulée (SNr) et des territoires corticaux limbique et pré-limbique. En ce qui concerne les voies striatales efférentes, les sites de projection de la matrice se situent préférentiellement dans la SNr et le globus pallidus interne (GPi), structure qui, chez le Rat, correspond au noyau entopédonculaire (EP). Les neurones des striosomes se projettent en revanche vers la SNc (Jimenez-Castellanos & Graybiel, 1987). Cette voie striato-nigrale est généralement considérée comme un circuit de retour assurant une régulation de type « feedback » sur la voie dopaminergique nigro-striatale (Domesick, 1981). Il semble cependant que les neurones striataux à projection pallidale ou nigrale ne soient pas répartis selon cette compartimentation striosomes/matrice. Les neurones thalamiques provenant des noyaux intralaminaires et se projetant en direction du striatum obéissent en revanche à cette compartimentation striosomes/matrice (*pour revue* : Gerfen, 1992). Ainsi, les afférences provenant des noyaux parafasciculaire/centro-médian innervent la matrice alors que les striosomes reçoivent des projections issues de zones plus restreintes des noyaux intralaminaires du thalamus.

1.1.1.1 LES NEURONES STRIATAUX

D'un point de vue cytologique, le striatum est composé de plusieurs populations de cellules neuronales qui se distinguent par des critères morphologiques (taille du soma et aspect des neurites), par les neurotransmetteurs et neuropeptides qu'ils expriment (GABA, somatostatine, acétylcholine, neuropeptide Y, enképhalines, dynorphines ou encore substance P ; Table 1). On différencie généralement les neurones dont le corps cellulaire est de taille moyenne (10 à 20 µm de diamètre), représentant plus de 95 % des neurones striataux, des neurones ayant un gros corps cellulaire (20-60 µm de diamètre), lesquels ne représentent que 2 à 3 % de la population neuronale striatale (*pour revue* : Kawaguchi, 1997). Parmi les neurones à corps cellulaire de taille moyenne, les cellules portant des épines dendritiques (en

Types de neurones	Structure cible	Neurotransmetteur	Phénotype (molécules co-exprimées)
Neurones de projection			
"medium spiny"	GPe	GABA	Enképhalines
"medium spiny"	GPi/SNr	GABA	Substance P, dynorphines
"medium spiny"	SNc	GABA	Substance P
Interneurones			
"large aspiny"	-	ACh	
"medium aspiny"	-	GABA	
"medium aspiny"	-	GABA	Somatostatine, NPY
"medium aspiny"	-	GABA	Parvalbumine
"small aspiny"	-	GABA	Calretinine

Table 1 : Principaux types de neurones striataux.

Récapitulatif non exhaustif des principaux types de neurones de projection et interneurones du striatum. *Abréviations* : ACh, acétylcholine ; GPe, globus pallidus externe ; GPi, globus pallidus interne ; SNc, substance noire pars compacta ; SNr, substance noire pars reticulata ; NPY, neuropeptide Y (d'après « *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications* », 3th ed., Haines DE, Churchill Livingstone, 2004).

anglais « *medium spiny neurons* ») de type I représentent les neurones de projection du striatum, ou **neurones striataux efférents** (Figure 2A). Le soma de ces neurones présente une forme ovoïde ou polygonale qui donne naissance à une arborisation constituée de sept à dix troncs dendritiques primaires, formant de nombreuses collatérales intrinsèques, abondamment fournies en épines (*pour revue* : Smith & Bolam, 1990). L'arbre dendritique constitué par une seule de ces cellules peut ainsi atteindre 200 µm de diamètre chez le Rat. Les neurones épineux de taille moyenne reçoivent une innervation corticale massive qui n'est cependant pas exclusive. Ils donnent, en outre, naissance aux deux principales voies striatales efférentes se projetant, pour l'une, en direction du globus pallidus externe (GPe) et, pour la seconde, vers la SNr et le GPi (*pour revue* : Graybiel, 1990). Ces neurones, GABAergiques par nature, expriment également différents neuropeptides selon leur site de projection : les enképhalines pour les neurones striato-pallidaux ; la dynorphine et la substance P pour les neurones dont les terminaisons aboutissent à la SNr et au GPi. Les connexions qu'établissent ces neurones dans le striatum jouent un rôle déterminant dans l'organisation fonctionnelle des ganglions de la base (Figure 2B). Une faible proportion des neurones de taille moyenne (moins de 3 %) ne

porte pas ou peu d'épines dendritiques. Il s'agit des neurones non épineux de type I et III (en anglais « *aspiny neurons* ») et des neurones épineux de type II, qui constituent une partie de la population des **interneurones striataux** (*pour revue* : Kawaguchi, 1997). Certains de ces interneurones ont une fonction peptidergique, utilisant le neuropeptide Y et la somatostatine comme neurotransmetteurs, tandis que d'autres, essentiellement GABAergiques, co-

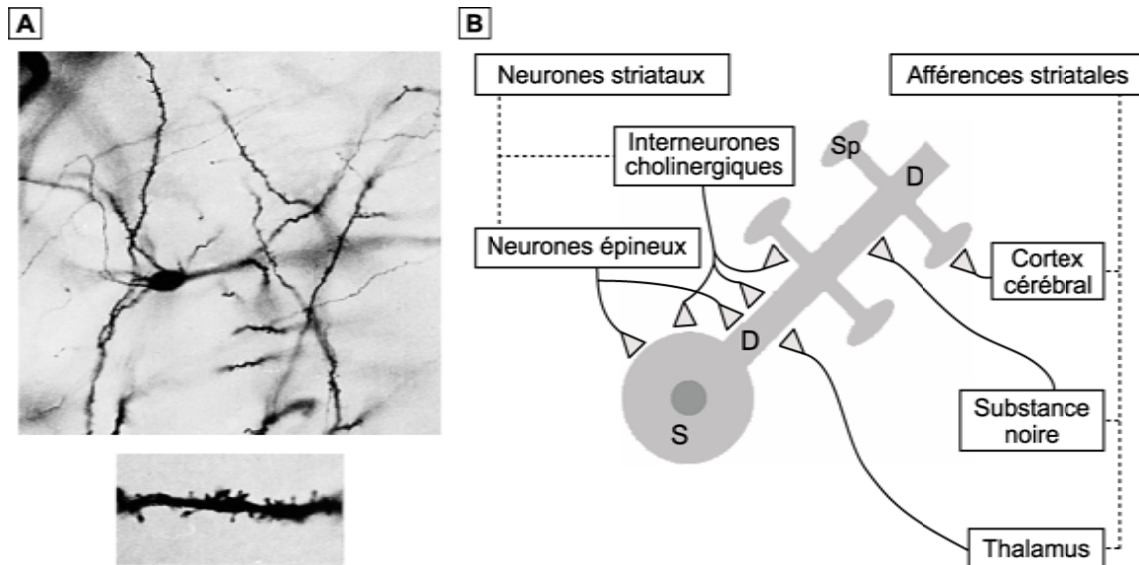


Figure 2 : Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles des neurones striataux.

(A) Neurone épineux de taille moyenne d'un cerveau de primate. L'insert inférieur montre les épines dendritiques caractéristiques de ces cellules (d'après « *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications* », 3th ed., Haines DE, Churchill Livingstone, 2004). (B) Organisation schématique d'un neurone épineux de taille moyenne illustrant les différents types de connexions qu'établissent ces neurones. Abréviations : S, soma, D, dendrite, Sp, épine dendritique (d'après Smith & Bolam, 1990).

expriment la parvalbumine. L'autre population d'interneurones du striatum correspond aux neurones à gros corps cellulaire, dépourvus d'épines dendritiques. Il s'agit de neurones cholinergiques (*pour revue* : Smith & Bolam, 1990). Ils présentent un soma de forme oblongue, à partir duquel prennent naissance des branches dendritiques relativement longues (de 250 à 400 μm en moyenne) qui forment un réseau dendritique diffus pouvant couvrir une surface de plus de 1 mm^2 chez le Rat. Des neurones intrinsèques exprimant la tyrosine hydroxylase (TH) et/ou la décarboxylase des acides aminés aromatiques (enzyme convertissant la L-DOPA en dopamine) ont été caractérisés plus récemment chez de

nombreuses espèces (*pour revue* : Smith & Kieval, 2000). Plus précisément, Meredith et coll. (1999) ont mis en évidence que, chez le rongeur, ces neurones apparaissent principalement localisés au niveau du striatum ventral et uniquement chez des animaux ayant préalablement subi une lésion des afférences nigro-striatales. Les travaux menés chez le Singe ont, en revanche, indiqué que ces cellules sont présentes dans le striatum d'animaux sains et qu'elles expriment en outre les transporteurs de la dopamine, suggérant un phénotype dopaminergique marqué (Betarbet et coll., 1997). Chez l'Homme, les travaux de Cossette et coll. (2005) ont révélé que les neurones striataux réagissant positivement à l'immuno-marquage TH forment quatre populations neuronales distinctes :

- la première est composée de neurones de taille moyenne ($\approx 200 \mu\text{m}^2$) qui constituent la majeure partie de cette population neuronale (58 %) ;
- la seconde, représentant environ 35 %, est composée de neurones aux corps cellulaires plus petits ($\approx 140 \mu\text{m}^2$) ;
- la troisième, constituée de neurones épineux à gros corps cellulaires (de 200 à 600 μm^2), est exprimée à hauteur de 6,5 % ;
- la dernière, très faiblement représentée (0,5 %), est composée de cellules présentant des caractéristiques morphologiques communes aux neurones et aux cellules gliales.

L'origine et le rôle de ces cellules restent cependant méconnus. Des études plus précises sont donc nécessaires pour déterminer les circonstances dans lesquelles elles acquièrent ce phénotype dopaminergique et de quelle manière elles s'intègrent dans les microcircuits striataux.

1.1.1.2 LES AFFÉRENCES STRIATALES

Les neurones projetant des fibres en direction du striatum sont principalement issus du cortex cérébral, des territoires dopaminergiques mésencéphaliques (A8, A9 et A10) et, dans une moindre mesure, du thalamus.

Les afférences corticales

Les projections cortico-striatales, qui utilisent le glutamate comme neurotransmetteur (Divac et coll., 1977), constituent la principale innervation du striatum. À titre d'exemple, les techniques histologiques ont permis d'évaluer le nombre de terminaisons corticales présentes dans le volume dendritique d'un unique neurone épineux striatal à environ 380 000, avec un nombre de contacts synaptiques estimé à 15 millions (Kincaid et coll, 1998, Figure 3B). Virtuellement, toutes les aires fonctionnelles du cortex participent à la projection cortico-striatale, mais les afférences provenant du cortex sensori-moteur sont, par exemple, nettement plus nombreuses que celles issues du cortex visuel ou préfrontal. Bien que les projections ipsilatérales (cortex sensori-moteur et visuel) soient majoritaires, des projections bilatérales (cortex prélimbique, cingulaire et moteur) ont été caractérisées chez le Rat (Donoghue & Herkenham, 1986). Les aires corticales innervent le striatum de manière diffuse et redondante : aucune région striatale n'est reliée à une aire corticale déterminée. Néanmoins, l'organisation topographique des afférences cortico-striatales permet de diviser le striatum en trois territoires fonctionnellement distincts (*pour revue* : McGeorge & Faull, 1989 ; Parent & Hazrati, 1995a ; Figure 3A) :

- un territoire associatif (putamen rostral et majorité du noyau caudé) innervé par les aires associatives frontales, temporales et pariétales ;

-
- un territoire sensori-moteur (portions dorso-latérales du putamen et de la tête du noyau caudé) recevant des afférences des aires motrice et sensori-motrice ;
 - un territoire limbique (parties ventrales du putamen et du noyau caudé) innervé par l'amygdale et l'hippocampe.

Pour comprendre l'organisation de la projection cortico-striatale, on se réfère généralement à la mosaïque striatale dont la dichotomie (matrice *vs.* striosomes) repose initialement sur des caractéristiques neurochimiques. En effet, chez le Rat, certaines régions du néocortex, peut-être toutes, se projettent à la fois vers la matrice et les striosomes. Cependant, ces deux types de projections proviennent de couches corticales différentes (*pour revue* : Graybiel, 1990) : les neurones de la partie profonde de la couche V et de la couche VI se projettent principalement vers les striosomes alors que les neurones de la partie superficielle de la couche V et des couches III et II se projettent vers la matrice. Un niveau d'organisation supplémentaire a été constaté chez le Rat (Kincaid et coll., 1998). Les projections cortico-striatales apparaissent constituées de trois types d'axones (Figure 3C) :

- le premier, caractérisé par une arborisation convergente et discontinue, occupe la majeure partie de la surface des striosomes du tiers caudal ;
- le second est représenté par une arborisation en croix étendue, exclusivement matricielle et confinée à la partie rostrale du striatum ;
- le troisième est constitué par une arborisation convergente et continue dont la localisation pourrait correspondre à celle des matrisomes (modules microexcitables au sein de la matrice dont la fonction reste inconnue).

En ce qui concerne les connexions établies par les projections cortico-striatales au niveau des neurones striataux, elles sont de type asymétrique et s'effectuent principalement au niveau apical des épines dendritiques des neurones striataux efférents (*pour revue* : Gerfen, 1992).

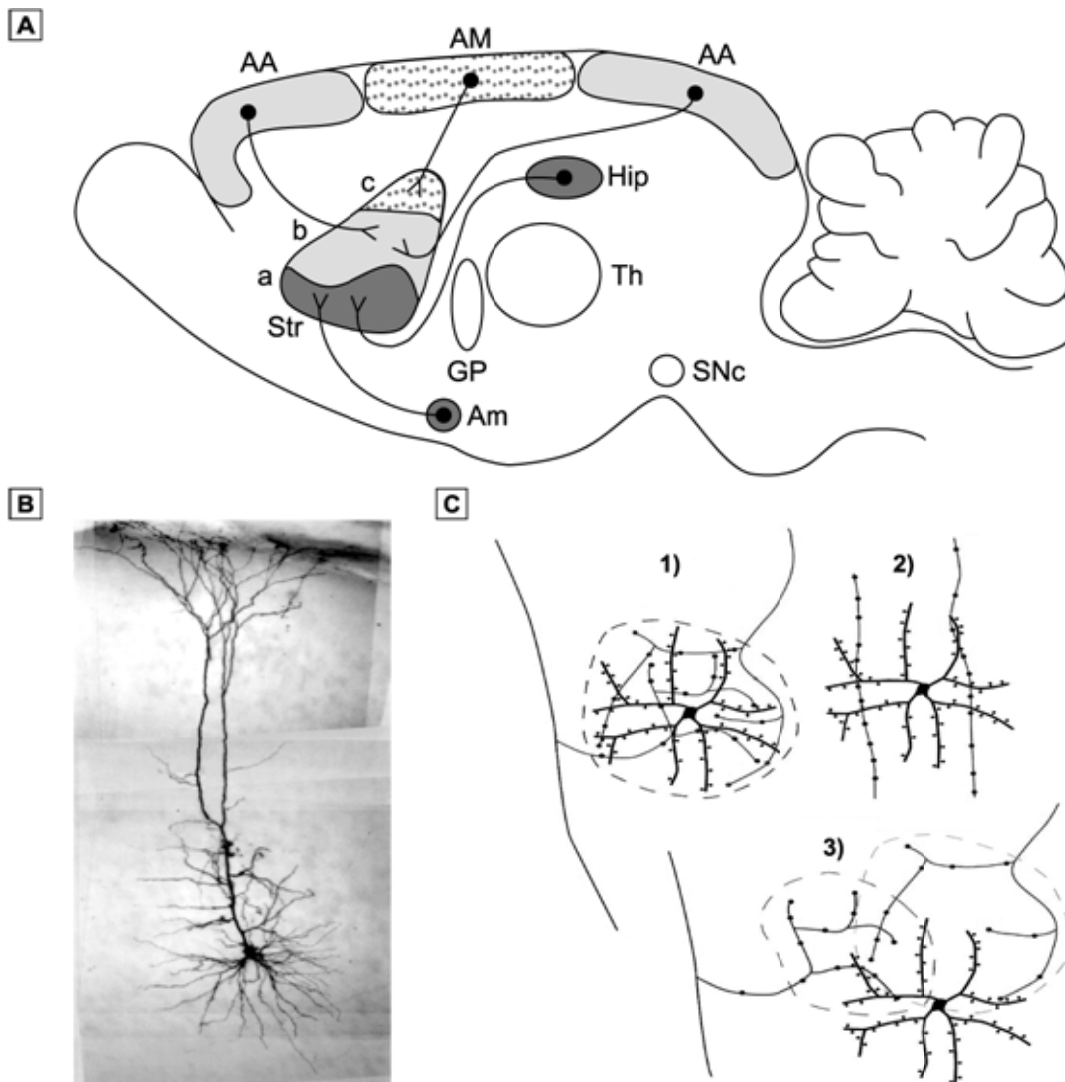


Figure 3 : Organisation anato-mo-fonctionnelle des projections cortico-striatales chez le Rat.

(A) Représentation schématique des territoires fonctionnels du striatum et de leurs afférences corticales chez le Rat. *Abréviations* : AA, Aires corticales associatives ; AM, Aires corticales motrices ; Am, Amygdale ; GP, Globus pallidus ; Hip, Hippocampe ; Snc, Substance noire pars compacta ; Str, Striatum (territoires : a, limbique ; b, sensori-moteur ; c, associatif) ; Th, Thalamus. (B) Reconstitution d'un neurone cortico-striatal originaire de la couche V du cortex cingulaire antérieur (d'après *Zheng & Wilson, 2002*). (C) Représentation schématique des différents types d'arborisation des terminaisons cortico-striatales. (1) Arborisation convergente discontinue. (2) Arborisation en croix étendue. (3) Arborisation convergente continue (d'après *Kincaid et coll., 1998*).

Plus récemment, les travaux de Lei et coll. (2004) ont suggéré que les neurones de projection striato-nigraux et striato-pallidaux pourraient recevoir des afférences corticales distinctes, issues de deux populations différentes de neurones corticaux. La première correspond aux protoneurones du faisceau pyramidal, voie motrice principale, essentielle dans les processus

de motricité volontaire. Cette voie est constituée d'une chaîne de deux neurones dont le premier, strictement cortico-spinal, prend naissance dans la partie inférieure de la couche V et traverse le striatum, où il forme des synapses par l'intermédiaire de ses collatérales axonales. La seconde population correspond à des neurones « intra-télecéphaliques », originaires de la couche III et de l'étage supérieur de la couche V, qui se projettent en direction des ganglions de la base ou du cortex. Les résultats obtenus par Lei et coll. (2004) suggèrent que les neurones striato-nigraux pourraient être préférentiellement innervés par les afférences corticales « intra-télecéphaliques » tandis que les neurones striato-pallidaux seraient la cible privilégiée des projections issues des neurones du tractus pyramidal. Cette connectivité corticale différente pourrait rendre compte des effets respectivement exercés par les voies efférentes directe et indirecte sur l'induction des mouvements volontaires et la répression des mouvements involontaires.

Les afférences mésencéphaliques

Les projections issues du mésencéphale, essentiellement dopaminergiques, constituent la deuxième innervation majeure du striatum. Chez le Rat, le nombre de neurones dopaminergiques mésencéphaliques est estimé de 15 000 à 20 000 par hémisphère (Björklund & Lindvall, 1984). Les techniques histologiques ont également permis de différencier, chez le Rat, trois ensembles de corps cellulaires dopaminergiques dans le mésencéphale (Figure 4) :

- le groupe A8, correspondant à l'extension postéro-latérale de la SNc ;
- le groupe A9, correspondant à la SNc ;
- le groupe A10, correspondant à l'ATV.

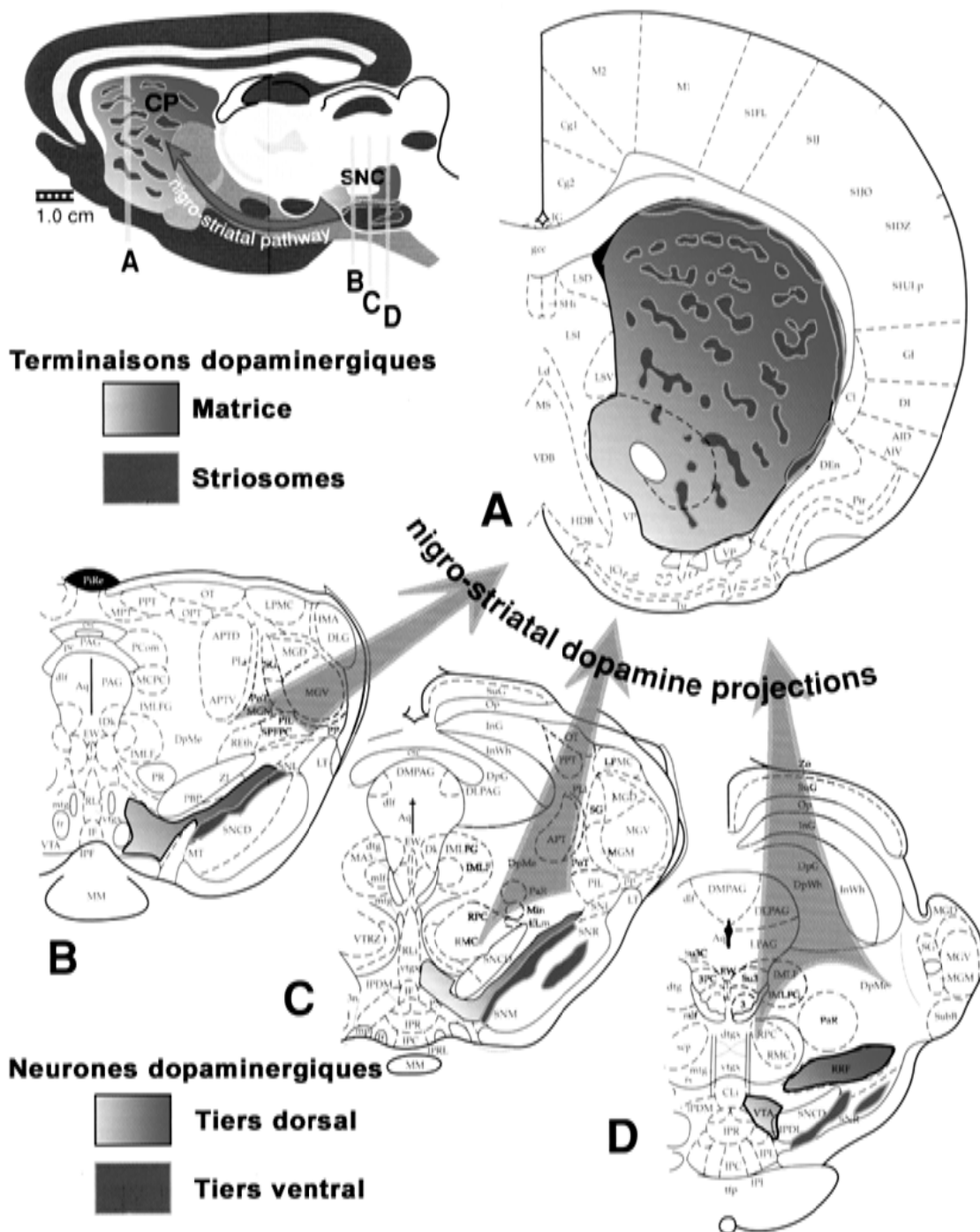


Figure 4 : Organisation anatomo-fonctionnelle des projections nigro-striatales chez le Rat.

Représentation schématique de l'innervation dopaminergique des striosomes et de la matrice du striatum (A) à partir des différentes structures dopaminergiques du mésencéphale (B, C et D). Les neurones dopaminergiques se projetant vers la matrice proviennent de la partie dorsale de la SNc, de l'ATV et de l'aire rétro-rubrale (B, C et D) tandis que ceux se projetant vers les striosomes sont issus de la partie ventrale de la SNc et des îlots dopaminergiques présents dans la SNr (B, C et D). *Abbreviations* : CP, caudé-putamen ; SNC, substance noire pars compacta ; VTA, aire tegmentale ventrale ; RRF, aire rétro-rubrale (d'après « *The Rat Nervous System* » 3th edition, G. Paxinos, Elsevier Academic Press, 2004).

Deux voies ascendantes prenant naissance au niveau de ces groupes cellulaires ont été mises en évidence : le système méso-striatal et le système méso-cortico-limbique (Björklund & Lindvall, 1984 ; *pour revue* : Smith & Kieval, 2000).

Le système méso-striatal regroupe, d'une part, les projections de la SNc vers la partie dorsale du striatum qui, avec quelques projections minoritaires provenant de la SNr, de la région latérale de l'ATV et du noyau rétro-rubral, constituent la voie nigro-striatale et, d'autre part, les projections de l'ATV vers la portion ventrale du striatum. Les corps cellulaires des neurones composant la voie nigro-striatale, regroupés dans une région cérébrale restreinte, donnent naissance à de fins axones. Ces axones, non myélinisés, se regroupent au sein du faisceau médian du télencéphale (MFB, en anglais « *medial forebrain bundle* »). Ils présentent, en outre, des varicosités régulièrement espacées dont les nombreuses ramifications permettent l'innervation d'un large territoire au niveau striatal. Cette innervation divergente est organisée selon une topologie précise : les fibres issues de la région médiane de la SNc innervent la partie médiane du striatum tandis que celles originaires de sa partie antérieure se projettent au niveau du striatum postérieur. Les terminaisons des neurones dopaminergiques mésencéphaliques établissent des contacts synaptiques symétriques dits "en passant" au niveau du cou des épines dendritiques, des troncs dendritiques proximaux et parfois même des corps cellulaires des neurones striataux efférents, constituant les voies striato-nigrale (Kubota et coll., 1986a) et striato-pallidale (Kubota et coll., 1986b). Ces connexions synaptiques ont été mises en évidence grâce à des techniques immuno-histochimiques marquant l'enzyme de synthèse de la dopamine, la tyrosine hydroxylase.

Le système méso-cortico-limbique comprend le système méso-limbique, dont les projections issues de l'ATV innervent le noyau accumbens, le septum et l'amygdale, et le système méso-cortical dont les projections originaires de l'ATV et de la partie médiane de la SNc forment

des synapses au niveau du septum et de l'amygdale ainsi que des cortex piriforme, cingulaire et entorhinal (*pour revue* : Smith et Kieval, 2000).

Plus récemment, un troisième type de projection, de nature non dopaminergique, a été mis en évidence par Rodriguez & Gonzalez-Hernandez (1999). Il apparaît, en effet, qu'un faible nombre de cellules nigrales, utilisant le GABA comme neurotransmetteur, se projette vers le striatum. Ces neurones GABAergiques nigro-striataux semblent, en outre, présenter des caractéristiques électrophysiologiques similaires à celles des cellules GABAergiques nigrales se projetant sur le thalamus.

Les afférences thalamiques

Les neurones thalamo-striataux proviennent principalement des noyaux thalamiques intralaminaires. La partie rostrale du complexe intra-laminaire comprend, chez le primate, les noyaux centro-médian, para-central et centro-latéral alors que sa partie caudale correspond au complexe centro-médian-parafasciculaire. Ce complexe n'est pas clairement délimité chez le rongeur. La partie latérale du noyau parafasciculaire est considérée comme homologue au noyau centro-médian du primate, alors que sa partie médiane est similaire au noyau parafasciculaire propre au primate. Le complexe centromédian-parafasciculaire (ou son équivalent chez le rongeur) se divise en cinq compartiments principaux qui assurent une innervation de l'ensemble des régions striatales (*pour revue* : Smith et coll., 2004). Ces afférences thalamiques glutamatergiques présentent des similitudes avec les afférences corticales en raison des synapses asymétriques qu'elles forment également au contact des neurones striataux épineux et de la forte stimulation qu'elles y exercent. Il semble, en revanche, que les terminaisons thalamo-striatales, topographiquement organisées selon les axes antéro-postérieur et médio-latéral, se distinguent des neurones cortico-striataux en ce qui

concerne les cibles striatales au contact desquelles elles font synapse. En effet, les projections originaires de la partie caudale des noyaux thalamiques intralaminaires forment préférentiellement des contacts synaptiques au niveau des neurones striataux de la voie efférente directe (*pour revue* : Smith et coll., 2004), alors que les neurones cortico-striataux, bien que de manière probablement différente (Lei et coll., 2004), se projettent à la fois sur les neurones striataux constituant les voies striatales efférentes directe et indirecte. Les connexions synaptiques que forment ces deux types de projection s'effectuent, en outre, au niveau d'éléments cellulaires différents, puisque les terminaisons thalamo-striatales pointent principalement vers les dendrites des neurones striataux alors que les afférences cortico-striatales en ciblent préférentiellement les épines. Enfin, alors que les terminaisons cortico-striatales et nigro-striatales peuvent former des synapses au niveau d'une même épine dendritique, cette convergence avec les afférences dopaminergiques n'existe pas concernant les terminaisons thalamo-striatales (*pour revue* : Smith et coll., 2004).

Le cortex et la SNc renferment donc les corps cellulaires des neurones constituant les deux principales afférences striatales. Le thalamus innerve également le striatum, mais dans une moindre mesure. D'autres afférences, plus rares encore, originaires du globus pallidus, du noyau sous-thalamique (NST), du noyau dorsal du raphé ou du noyau pédonculopontin (*pour revue* : Parent, 1990), ont également été mises en évidence.

1.1.1.3 LES EFFÉRENCES STRIATALES

Le striatum, par l'intermédiaire de neurones principalement GABAergiques, innerve le globus pallidus et la SNr, par deux voies efférentes distinctes (Figure 5) : la voie striato-pallidale et la voie striato-nigrale. Ces projections sont organisées topographiquement de telle sorte que la compartimentation fonctionnelle du striatum est reproduite dans les noyaux de sortie des

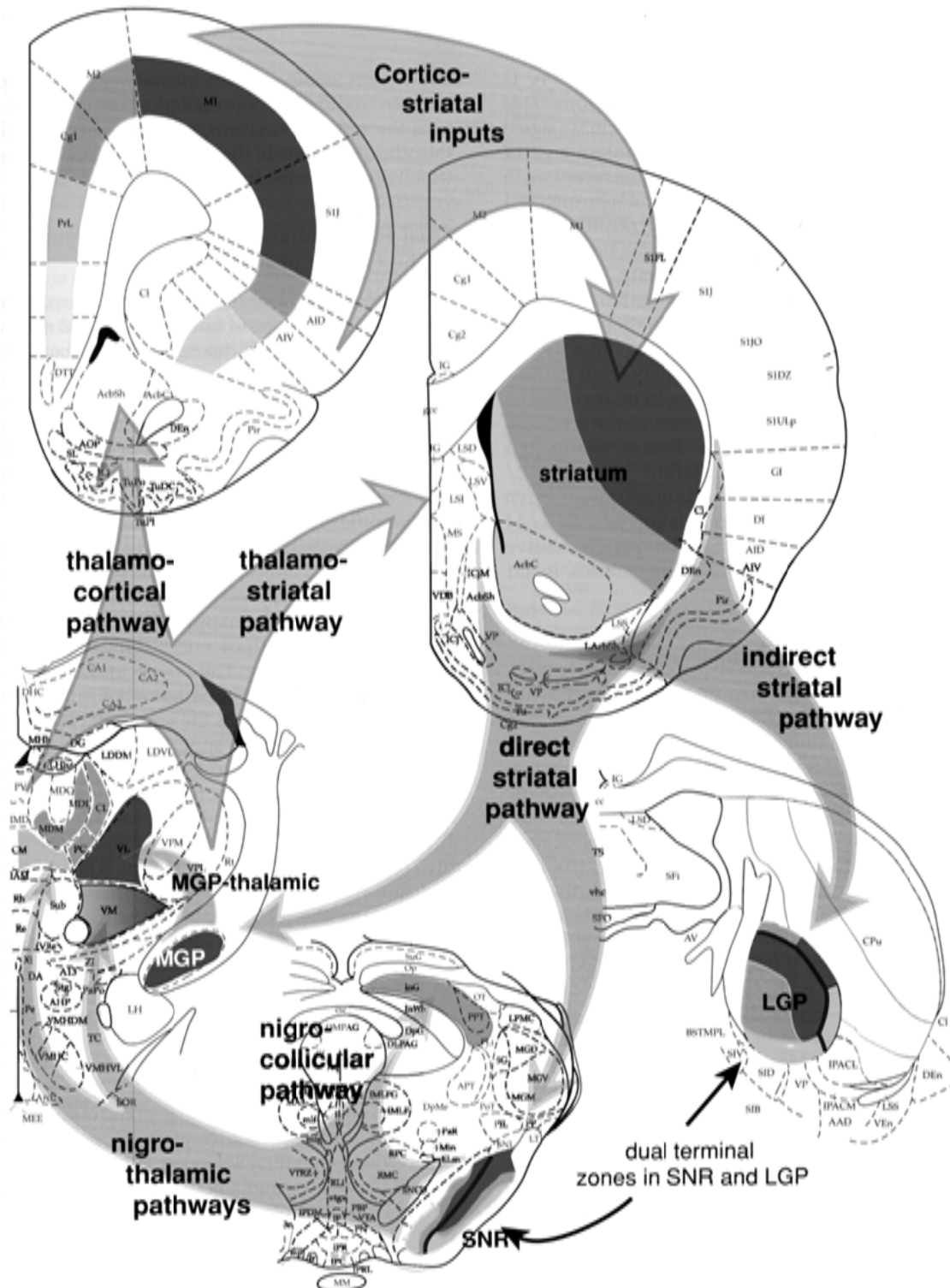


Figure 5 : Organisation anato-fonctionnelle des projections striatales efférentes chez le Rat.

Représentation schématique illustrant le maintien de l'organisation topographique du cortex au niveau des voies striatales efférentes et des différentes structures des ganglions de la base chez le Rat. Abréviations : LGP, globus pallidus latéral ; SNR, substance noire pars reticulata ; MGP, globus pallidus médian (d'après « *The Rat Nervous System* » 3th edition, G. Paxinos, Elsevier Academic Press, 2004).

ganglions de la base ainsi qu'au niveau du pallidum (*pour revue* : Parent & Hazrati, 1995a ; Deniau et coll., 1996).

La **voie striato-pallidale** représente un contingent de fibres GABAergiques denses provenant des neurones épineux de taille moyenne et innervant les segments externe (GPe) et interne (GPi) du globus pallidus. Cette innervation se caractérise par le fait que le GPe (qui correspond au globus pallidus chez le Rat) reçoit les terminaisons de neurones GABAergiques striataux co-exprimant les enképhalines, tandis que le GPi (dont l'équivalent chez le Rat est le noyau entopédonculaire) est innervé par des fibres striatales GABAergiques enrichies en substance P et/ou en dynorphine (*pour revue* : Parent, 1990). De plus, étant donnée la forte densité cellulaire du striatum par rapport à celle des structures cibles, il existe probablement un très haut degré de convergence des projections striatales dans ces structures (*pour revue* : Smith et coll., 1998).

La **voie striato-nigrale** est constituée de neurones GABAergiques qui se projettent vers la SNr et s'organisent en une topographie remarquable. Chaque région striatale se projette en effet sur toute la longueur de la SNr, en respectant les relations topographiques dans le sens médiolatéral mais les inversant dans le sens dorsoventral. Ce faisceau de projection présente une organisation complexe, suivant une répartition lamellaire, généralement qualifiée de « peau d'oignon » (Deniau et coll., 1996). Les neurones GABAergiques à l'origine de cette voie expriment également des neuropeptides, principalement la substance P et la dynorphine. Il apparaît, en outre, que certains neurones GABAergiques, situés dans la partie caudale du striatum et co-exprimant également la substance P, se projettent à la fois vers la SNr et la SNC (Bolam & Smith, 1990).

L'indépendance anatomique des voies striato-pallidale et striato-nigrale pourrait être remise en cause par des études plus récentes indiquant que des collatérales relient entre-elles ces deux voies (Aizman et coll., 2000).

1.1.2 LES GANGLIONS DE LA BASE

Bien que le terme « ganglion » soit en général appliqué au système nerveux périphérique, les ganglions de la base, encore appelés noyaux gris centraux, représentent un ensemble de structures cérébrales d'origine diencephalique et mésencéphalique. La partie dorsale des ganglions de la base comprend le noyau caudé et le putamen (constituant le néostriatum, décrit précédemment) ainsi que le globus pallidus (formant le paléostriatum). Bien que ne faisant pas partie des ganglions de la base au sens strict, la substance noire, le noyau sous-thalamique et le noyau pédonculopontin sont généralement associés à ces structures avec lesquelles ils sont interconnectés. La partie ventrale des ganglions de la base comprend des structures localisées sous la commissure antérieure et représentées par la substantia innominata (encore appelée substance innommée de Reichert), le noyau basal de Meynert, le noyau accumbens et le tubercule olfactif.

Les ganglions de la base forment un réseau neuronal mettant en jeu des circuits complexes au sein desquels les fibres extra-pyramidales, responsables de l'activité motrice automatique et réflexe (équilibre, adaptation posturale, retrait aux stimuli douloureux), forment des relais. Les noyaux gris centraux sont, en outre, impliqués dans différentes formes d'apprentissage sensori-moteur, en particulier la mémoire procédurale. Fonctionnellement, les ganglions de la base présentent quatre grandes caractéristiques. Premièrement, des dommages ou dysfonctionnements touchant sélectivement ces structures perturbent les fonctions motrices et peuvent également produire des déficits significatifs dans des fonctions telles que la cognition, la perception ou l'activité mentale. De plus, les ganglions de la base apparaissent

anatomiquement et fonctionnellement divisés en circuits parallèles traitant des informations comportementales distinctes. Ces réseaux juxtaposés sont au nombre de cinq : les circuits moteur, oculo-moteur, dorsolatéral préfrontal, latéral orbitofrontal et cingulaire antérieur. Par ailleurs, la fonction initiale des ganglions de la base est généralement considérée comme étant d'assurer un rôle désinhibiteur (*pour revue* : Silkis, 2000 ; *cf.* chapitre suivant). Enfin, les pathologies associées à des dysfonctionnements des ganglions de la base peuvent être décrites comme résultant d'altérations au niveau des interactions neurochimiques qu'entretiennent entre elles les différentes structures des ganglions de la base. D'un point de vue moteur, des dysfonctionnements au niveau des ganglions de la base sont à l'origine de pathologies sévères, illustrées par la maladie de Parkinson, la chorée de Huntington, ou le syndrome de Gilles de la Tourette.

1.1.2.1 DESCRIPTION DU MODÈLE ANATOMO-FONCTIONNEL CLASSIQUE

Sur la base des données anatomiques, pharmacologiques et physiologiques, obtenues chez l'Homme et l'animal au cours des années 1980, le premier modèle d'organisation anatomo-fonctionnelle des noyaux gris centraux a été proposé par Albin et collaborateurs en 1989. Ce modèle, comprenant deux circuits parallèles, a ensuite été repris par Alexander et Crutcher (1990) ainsi que par DeLong (1990). Considéré comme le schéma de référence en ce qui concerne l'organisation des ganglions de la base, ce modèle explique le rôle exercé par les noyaux gris centraux sur le contrôle du mouvement dans les conditions physiologiques. Il a, en outre, permis de conceptualiser les altérations fonctionnelles induites par la dégénérescence de la voie dopaminergique nigro-striatale dans le cadre de la maladie de Parkinson (DeLong, 1990).

Selon le modèle initialement proposé par Albin et coll. (1989), le striatum, qui reçoit des afférences excitatrices massives de l'ensemble du cortex, constitue l'entrée principale du circuit des ganglions de la base. Il est connecté aux structures de sorties, la SNr et le GPi (noyau entopédonculaire chez le Rat), par l'intermédiaire de deux voies dites « directe » et « indirecte ». La **voie directe**, mono-synaptique et inhibitrice, est composée de neurones striataux GABAergiques qui co-expriment la substance P et/ou la dynorphine et se projettent directement vers les structures de sortie. La **voie indirecte**, poly-synaptique, est globalement excitatrice puisqu'elle se compose de deux connexions inhibitrices et d'une excitatrice. La première connexion est représentée par les neurones striataux qui expriment le GABA et les enképhalines et se projettent en direction du GPe (globus pallidus chez le Rat). La seconde connexion fait intervenir la projection des neurones GABAergiques pallidiaux en direction du noyau sous-thalamique (NST). Enfin, la dernière connexion correspond à la projection des neurones glutamatergiques du NST vers les structures de sortie. Ces structures envoient à leur tour des projections, de type GABAergique inhibiteur, en direction du thalamus qui exerce un effet excitateur sur le cortex cérébral, activant ainsi les voies motrices corticales (Figure 6A). Suivant ce schéma, le contrôle exercé par les noyaux gris centraux sur les fonctions motrices réside dans la capacité de ce double circuit direct-indirect à produire des effets opposés au niveau des structures de sortie des ganglions de la base, lesquels sont en relation immédiate avec le cortex. L'activation de la voie directe, qui inhibe les structures de sortie des ganglions de la base, provoque ainsi une désinhibition de la voie thalamo-corticale, engendrant un effet permissif sur l'expression des activités corticales. Ce processus de désinhibition, considéré comme central dans la physiologie des noyaux gris centraux, est généralement avancé pour rendre compte des processus d'initiation du mouvement. À l'inverse, la mise en jeu de la voie indirecte engendre un effet répressur sur l'expression des programmes moteurs en renforçant l'inhibition exercée au niveau des voies thalamo-corticales. On considère que ce processus

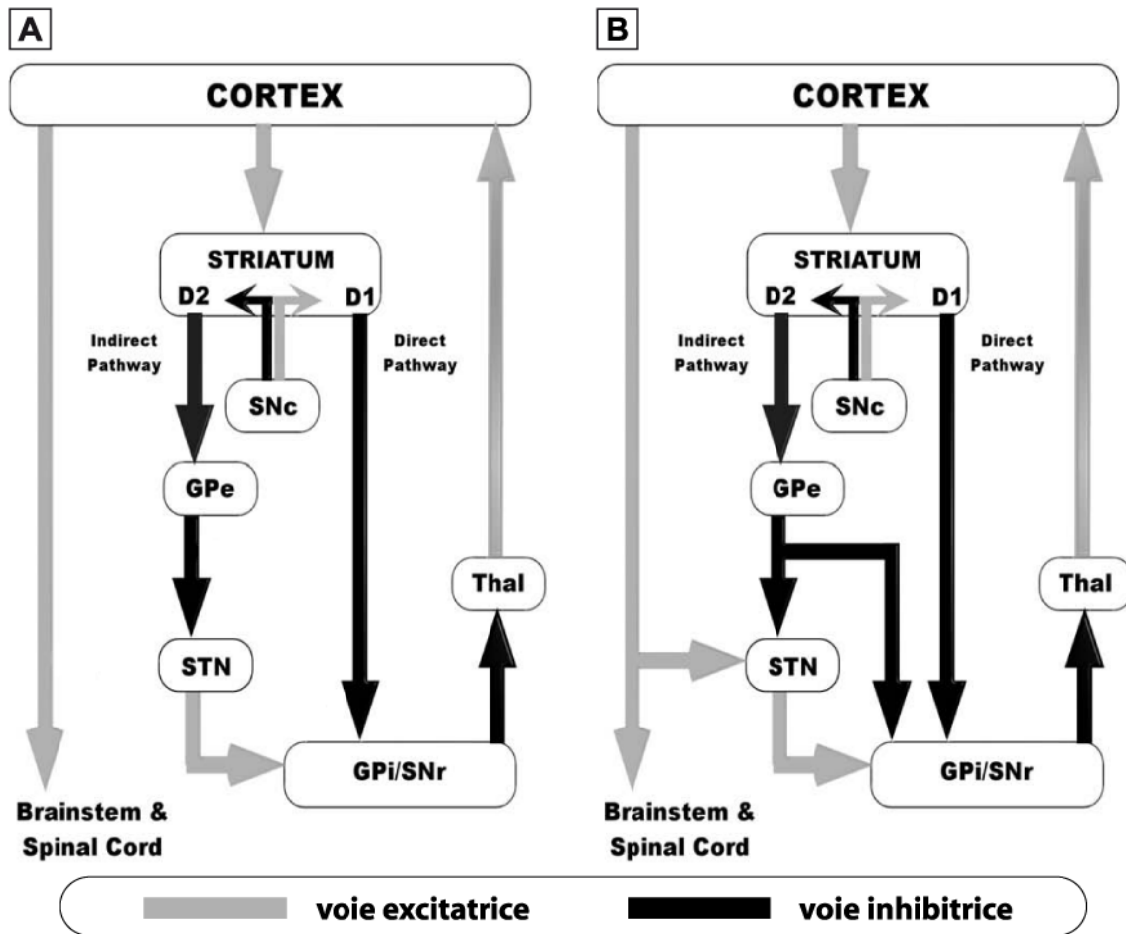


Figure 6 : Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base.

(A) Représentation schématique illustrant l'organisation anatomique et fonctionnelle des ganglions de la base selon le modèle courant. (B) Représentation schématique prenant en compte certaines données anatomiques ignorées par le modèle courant : connexions directes entre le GPe et le complexe GPi/SNr et entre le cortex cérébral et le NST. *Abréviations* : GPe, globus pallidus externe ; GPi, globus pallidus interne ; STN, noyau sous-thalamique ; SNr, substance noire pars reticulata ; SNc, substance noire pars compacta ; Thal, thalamus (d'après *Walter et coll., 2005*).

pourrait participer au contrôle de l'amplitude du mouvement et à l'inhibition des programmes moteurs inappropriés. Dans les conditions physiologiques normales, il s'établit un équilibre entre l'action inhibitrice de la voie directe et l'action excitatrice de la voie indirecte qui permet aux ganglions de la base d'exercer leurs fonctions régulatrices de la motricité. Le contrôle de cet équilibre est, en raison de l'expression différente des récepteurs dopaminergiques au niveau striatal, assuré par les neurones dopaminergiques originaires de la SNc. De nombreux travaux indiquent en effet que les récepteurs dopaminergiques de type D₁ sont principalement exprimés par les corps cellulaires des neurones de la voie striato-pallidale

directe, tandis que les récepteurs D₂ sont préférentiellement localisés sur les neurones striato-pallidaux appartenant à la voie indirecte (*pour revue* : Suremeier et coll., 2007). Le recrutement des récepteurs D₁, couplés à une protéine G_s, augmente l'activité de l'adénylyl cyclase, produisant une stimulation des cellules sur lesquelles ils sont localisés. La mise en jeu des récepteurs D₂, couplés à une protéine G_i, inhibe en revanche l'activité neuronale. La dopamine libérée au niveau striatal provoquerait donc l'activation des neurones de la voie directe et l'inhibition des neurones de la voie indirecte. Dans ce contexte, la perte progressive des neurones dopaminergiques résultant de la maladie de Parkinson serait à l'origine d'un profond déséquilibre entre les niveaux d'activité de ces deux voies : la voie directe deviendrait en effet « hypoactive » tandis que la voie indirecte serait « hyperactive ». Ces phénomènes ont tous deux pour conséquences une augmentation de l'activité des structures de sortie des ganglions de la base.

1.1.2.2 REMISE EN CAUSE DE CE MODÈLE

Le modèle d'organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base en deux circuits parallèles, initialement proposé par Albin et collaborateurs (1989), a apporté une aide précieuse dans la compréhension des troubles moteurs résultant des dysfonctionnements de cet ensemble de structures. Toutefois, ce modèle ne prend pas en compte toute la complexité des ganglions de la base, notamment l'existence de certaines voies anatomiques (*pour revue* : Chesselet & Delfs, 1996). Les études biochimiques et électrophysiologiques sont, en outre, de plus en plus nombreuses à remettre en cause ce schéma classique (*pour revue* : Parent & Cicchetti, 1998).

Une des critiques majeures à l'encontre du modèle classique concerne la ségrégation des projections striatales efférentes. En effet, il a été montré, chez le Rat, que les neurones striataux efférents, à l'origine des voies directe et indirecte, présentent de nombreuses

collatérales intra-striatales, si bien que ces neurones pourraient être étroitement interconnectés au sein même du striatum (Yung et coll., 1996), remettant en cause le concept initial de deux voies totalement séparées. En effet, certaines terminaisons du GPe (globus pallidus chez le Rat), originaires du striatum, sont immuno-positives pour la substance P, suggérant que des neurones de la voie « directe » émettent également des collatérales dans cette structure. De façon similaire, des terminaisons immuno-positives pour les enképhalines sont retrouvées dans la SNr, indiquant que les axones de la voie « indirecte » présentent des arborisations collatérales dans une structure classiquement associée à la voie « directe » (Wu et coll., 2000). Ces mêmes auteurs ont en outre indiqué que, chez le Rat, de telles arborisations collatérales pourraient concerner 2/3 des neurones striataux efférents. Chez l'Homme et le Singe, Reiner et coll. (1999) ont récemment confirmé la notion classique selon laquelle les neurones GABAergiques striataux se projetant sur le GPi contiennent à la fois de la substance P et de la dynorphine mais pas les enképhalines, ces dernières étant exprimées uniquement dans les neurones se projetant vers le GPe. Toutefois, ces auteurs ont indiqué que les neurones à l'origine de la voie directe se projetant sur la SNr contiennent de la substance P, mais pas de dynorphine. En outre, certains neurones GABAergiques co-exprimant les enképhalines apparaissent également contenir de la substance P (Reiner et coll., 1999), remettant en partie en cause le concept d'une ségrégation des neurones striataux efférents reposant sur une expression différente des neuropeptides. Le concept d'une ségrégation reposant sur l'expression différente des récepteurs dopaminergiques D₁ et D₂ dans le striatum est, de plus, également contesté. En effet, des études d'hybridation *in situ* ont montré qu'il existait une co-localisation des ARNm codant les récepteurs D₁ et D₂ dans de nombreux neurones striataux (*pour revue* : Surmeier et coll., 2007). Plus récemment, Aizman et coll. (2000) ont également indiqué que les récepteurs D₁ et D₂ pourraient être co-localisés dans virtuellement tous les neurones épineux striataux. En outre, l'administration intra-striatale d'un agoniste D₁ (le SKF

38393) ou d'un agoniste D₂ (le quinpirole) induit, chez le Rat, des modifications métaboliques identiques dans les trois principaux sites de projection du striatum (Blandini et coll., 2000). Ces observations remettent ainsi partiellement en cause le principe admis de deux voies de sortie individualisées, et d'une ségrégation des récepteurs dopaminergiques D₁ et D₂ régulant chacune des deux voies.

Le concept de voie directe et indirecte est également contesté par des données anatomiques montrant l'existence de projections directes du GPe sur les structures de sortie des ganglions de la base (Parent & Hazrati, 1995b). Ainsi, le GPe peut interagir directement avec la SNr et le GPi (noyau entopédonculaire chez le Rat), sans passer par le relais anatomique représenté par le NST (Figure 6B). De plus, les relations existant entre le GPe et le NST, deux structures associées à la voie indirecte, ne semblent pas limitées à une simple fonction de relais entre le striatum et les voies de sortie. En effet, les neurones du NST, qui reçoivent des afférences du GPe, se projettent en retour sur les neurones du GPe, donnant ainsi naissance à une boucle exerçant un contrôle rétroactif sur l'activité de la voie indirecte (*pour revues* : Parent & Hazrati, 1995b ; Smith et coll., 1998). De même, il a été montré que les neurones du GPe se projettent également vers les noyaux réticulaires du thalamus, suggérant que cette structure pourrait influencer les fonctions motrices indépendamment des structures de sortie (Shammah-Lagnado et coll., 1996). Enfin, dans le modèle classique, la voie cortico-subthalamique est sous-représentée. En effet, plusieurs études ont montré l'existence de projections directes du cortex vers le NST (*pour revue* : Smith et coll., 1998), indiquant qu'à l'instar du striatum le NST pourrait également constituer une structure d'entrée des ganglions de la base (Figure 6B). Le fait que la stimulation à haute fréquence du NST représente le traitement neurochirurgical le plus efficace des perturbations motrices exprimées par des patients parkinsoniens ainsi que des dyskinésies tardives induites par la thérapie L-DOPA (*pour revue* : Pahwa et coll., 2006) semble en accord avec cette suggestion. Les mécanismes

qui participent à cette restauration fonctionnelle grâce au NST restent cependant relativement controversés (*pour revue* : Garcia et coll., 2005).

1.2 SYSTÈMES DE NEUROTRANSMISSION ET DE NEUROMODULATION ÉTUDIÉS

La propriété fonctionnelle caractéristique des cellules excitables réside dans leur aptitude à recevoir, conduire et intégrer des informations. Bien que divers types de cellules puissent assumer certaines de ces fonctions, voire toutes, les neurones constituent une population cellulaire unique du fait de leur capacité à transmettre les informations au sein de réseaux qui contrôlent les comportements. Une grande variété de substances peut induire des effets neurotransmetteurs ou neuromodulateurs. La nature de ces substances neuroactives commence au niveau même du métabolisme des acides aminés (glutamate, GABA) pour s'étendre à des peptides éminemment plus complexes. Ces molécules neuroactives se fixent à des récepteurs spécifiques. L'existence de classes multiples de récepteurs pour un même neurotransmetteur semble, en outre, constituer une règle plus qu'une exception qui illustre toute la diversité fonctionnelle des réseaux neuronaux.

Dans le prochain chapitre, nous décrirons en détail les systèmes de neurotransmission (glutamate et dopamine) et de neuromodulation (enképhalines) striataux sur lesquels s'est focalisée notre étude.

1.2.1 LE GLUTAMATE

Le L-glutamate, considéré comme le principal neurotransmetteur de la voie cortico-striatale, représente la plus abondante substance neurostimulatrice du système nerveux central des mammifères. Fonctionnellement, il apparaît impliqué dans la majeure partie des fonctions

cérébrales en raison de son impact excitateur immédiat. Il possède, en outre, un rôle fondamental dans les processus de potentialisation à long terme (en anglais « long-term potentiation », LPT) qui sont considérés comme le substrat moléculaire des processus d'apprentissage et de mémoire (*pour revues* : Meldrum, 2000 ; Tzschentke, 2002). Les neurones glutamatergiques sont particulièrement abondants dans le cortex, à partir duquel ils se projettent dans de nombreuses structures sous-corticales incluant par exemple le striatum, le noyau accumbens, l'hippocampe, le complexe basolatéral de l'amygdale, la substance noire et le colliculus supérieur (Figure 7). De nombreuses voies glutamatergiques intrinsèques ont également été décrites dans l'hippocampe ainsi que des neurones de projection originaires de l'hippocampe et innervant l'hypothalamus, le noyau accumbens et le septum latéral.

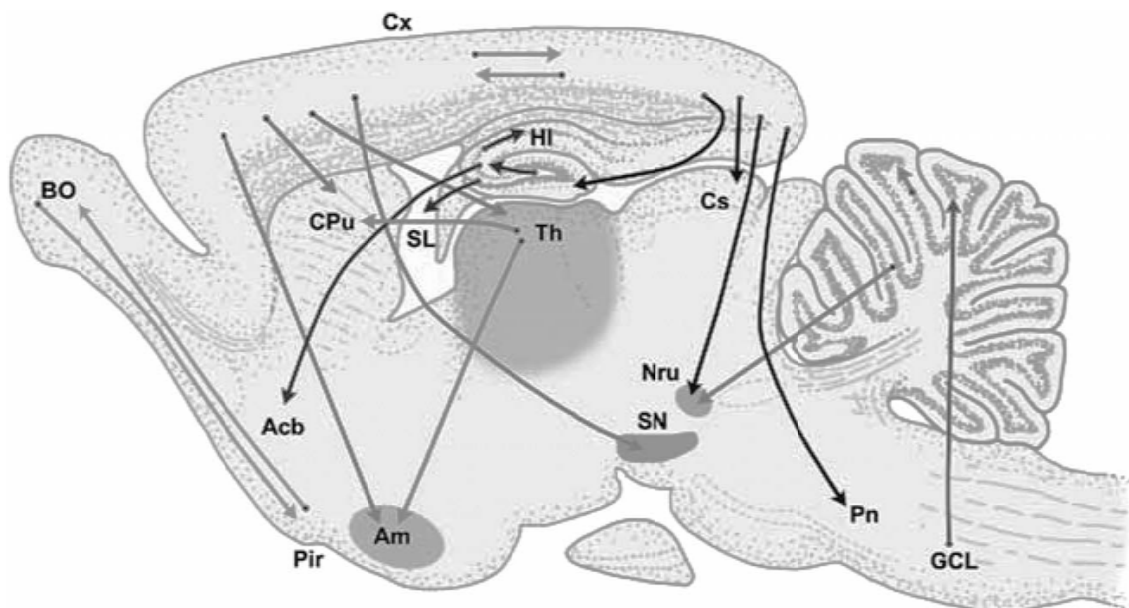


Figure 7 : Représentation schématique des principales voies glutamatergiques centrales chez le Rat.

Abréviations : Acb, noyau accumbens ; BO, bulbe olfactif ; CPu, caudé-putamen ; Cs, colliculus supérieur ; Cx, cortex ; GCL, couche granulaire du cervelet ; HI, hippocampe ; Nru, nucleus ruber (noyau rouge) ; Pn, noyau du pons ; Pir, cortex piriforme ; SL, septum latéral ; SN, substance noire ; Th, thalamus (d'après « *Neurotransmitters and Neuromodulator* » 2nd Ed, von Bohlen und Halbach & Dermietzel, Wiley-VCH, 2006).

1.2.1.1 BIOSYNTHÈSE ET DÉGRADATION

Le glutamate cérébral résulte uniquement d'une synthèse locale car cet acide aminé ne peut franchir la barrière hémato-encéphalique qui isole le tissu cérébral du système sanguin. Cette synthèse s'effectue au niveau mitochondrial, aussi bien dans les neurones que dans les cellules gliales qui sont particulièrement impliquées dans l'homéostasie de cet acide aminé (*pour revue* : Bak et coll., 2006). Le glutamate peut être synthétisé via le cycle de Krebs à partir de deux réactions. La première, prépondérante dans le système nerveux central, est une transamination à partir de l' α -cétoglutarate résultant de l'activité enzymatique de l'aminotransférase EC.2.6.1.1 (Figure 8A). La seconde est la réaction catalysée par la glutamate déshydrogénase (EC.1.4.1.3) dont l'équilibre est en faveur de la formation de glutamate. Le glutamate est aussi continuellement produit par le renouvellement des protéines et par action de la glutaminase dépendante du phosphate (en anglais « *phosphate-activated glutaminase* », PAG : EC.3.5.1.2 ; Figure 8A), une enzyme mitochondriale utilisant la glutamine comme substrat. La L-glutamine, qui contribue en fait à hauteur d'environ 80 % au maintien du taux de glutamate dans les synaptosomes (Bradford, 1978), est captée par les terminaisons glutamatergiques grâce à un mécanisme de capture dépendant du sodium (*pour revue* : Daikhin & Yudkoff, 2000). Le contrôle endogène de l'activité de la PAG semble principalement produit par le glutamate lui-même dont la libération massive dans la fente synaptique suffirait à augmenter l'activité de la PAG (Bradford, 1986).

Il n'existe pas d'enzyme extracellulaire capable d'inactiver de manière significative le glutamate présent dans le milieu extracellulaire, alors que celui-ci est toxique à forte dose pour les cellules neuronales (*pour revue* : Olney, 1990) et gliales (*pour revue* : Matute et coll., 2007). Le glutamate est, par conséquent, éliminé de la fente synaptique par des mécanismes de recapture impliquant les cellules nerveuses et gliales. Chez ces dernières, il est converti en glutamine par la glutamine synthétase, une enzyme exclusivement gliale

(Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979). La glutamine est ensuite libérée dans l'espace extracellulaire d'où elle pourra regagner les terminaisons neuronales (glutamatergiques ou

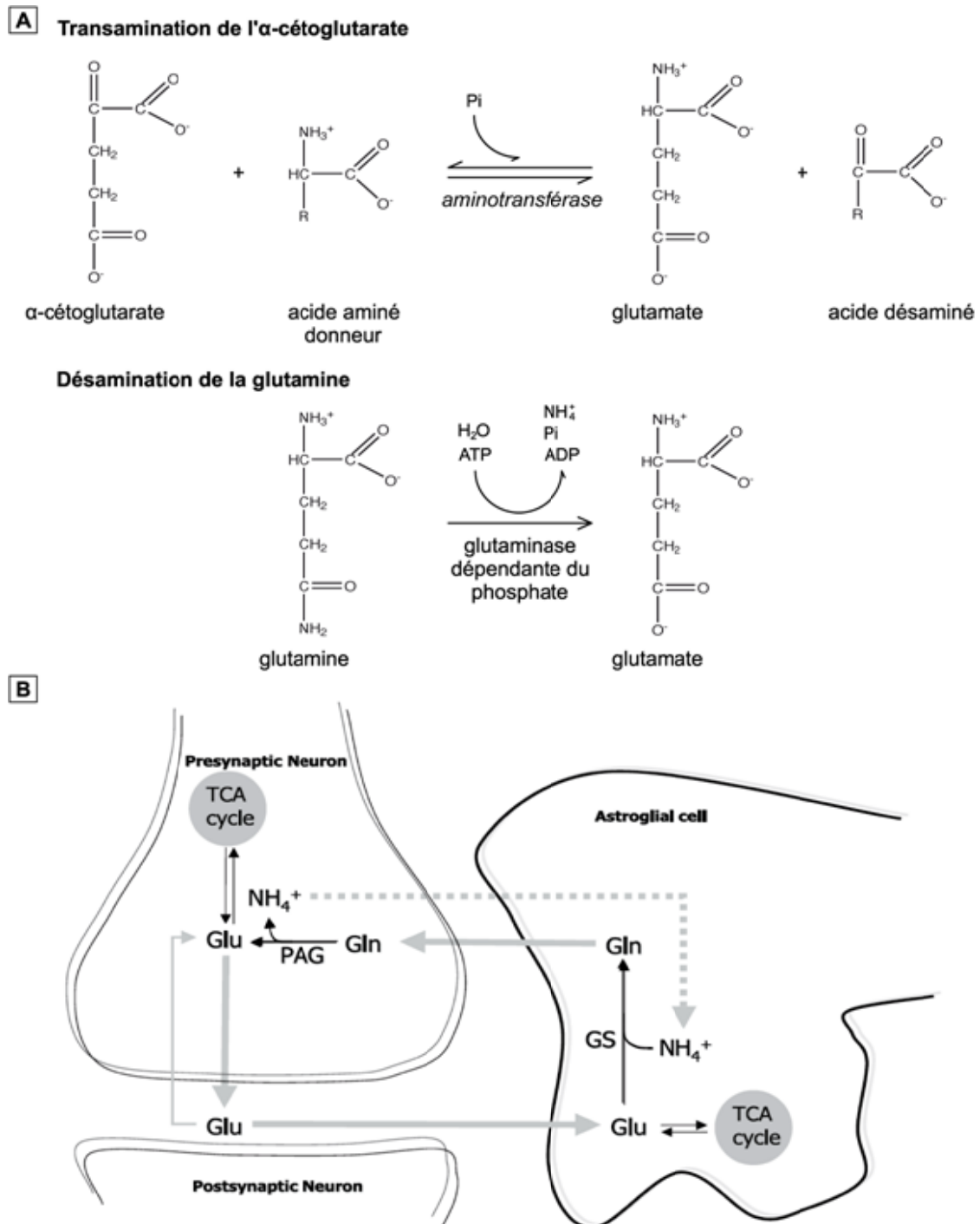


Figure 8 : Voies de biosynthèse et de recyclage du glutamate.

(A) Réactions de synthèse du glutamate. (B) Représentation schématique du cycle glutamine/glutamate. *Abréviations* : Glu, glutamate ; Gln, glutamine ; PAG, glutaminase activée par le phosphate ; TCA cycle, cycle des acides tricarboxyliques (d'après Bak et coll., 2006).

GABAergiques) pour y être reconvertie en glutamate. Ce mécanisme est généralement qualifié de « cycle glutamine-glutamate » (*pour revue* : Bak et coll., 2006 ; Figure 8B). Le glutamate peut, en outre, être transformé en α -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase.

1.2.1.2 STOCKAGE VÉSICULAIRE ET LIBÉRATION

Alors que les effets excitateurs du glutamate au niveau du cerveau et de la moelle épinière des mammifères sont connus depuis le début des années 1950 (*pour revue* : Meldrum, 2000), son statut de neurotransmetteur ne s'est imposé que vers la fin des années 1970. Néanmoins, les premières études suggérant l'implication de vésicules synaptiques dans son stockage et sa libération, processus classiquement retenus comme l'un des critères caractérisant les neurotransmetteurs, ne sont apparues que bien plus tardivement (Disbrow et coll., 1982 ; Naito & Ueda, 1985). L'existence de transporteurs vésiculaires du glutamate n'a de plus été démontrée que très récemment grâce aux techniques de clonage (Bellocchio et coll., 2000 ; Takamori et coll., 2000, Varoqui et coll., 2002). Ces études ont mis en évidence l'existence de trois transporteurs vésiculaires (VGLUT1, VGLUT2 et VGLUT3) dont seuls les deux premiers types apparaissent exprimés dans les neurones glutamatergiques. VGLUT1 est plus abondant au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe alors que VGLUT2 est préférentiellement localisé dans le diencephale et le rhombencéphale (*pour revue* : Takamori, 2006). VGLUT3 apparaît, quant à lui, être exprimé par des populations neuronales libérant d'autres neurotransmetteurs tels que les interneurons cholinergiques striataux ou les interneurons GABAergiques ou sérotoninergiques du cortex et de l'hippocampe (*pour revue* : Takamori, 2006). La topologie transmembranaire de ces transporteurs est supposée être constituée de huit à dix domaines transmembranaires. Ces transporteurs ont une affinité pour le glutamate 100 à 1000 fois plus faible que celle des transporteurs plasmiques du glutamate et, contrairement à ces derniers, ils apparaissent incapables de transporter le L-aspartate

(Reimer et coll., 2001). La concentration intravésiculaire de glutamate résultant de ce transport est estimée à 100 mmol/L (Meldum, 2000). L'activité des transporteurs semble dépendre du gradient électrochimique généré par une pompe H^+ -ATPase vésiculaire (Ozkan & Ueda, 1998). Ce transport manifeste, en outre, une dépendance biphasique aux ions Cl^- , lesquels, à faible concentration, activent les transporteurs et, à fortes concentrations, les inhibent. Les ions Cl^- pourraient servir à compenser l'entrée de cations résultant de l'activité de la pompe H^+ -ATPase mais le mécanisme par lequel les ions chlorures interagissent avec les transporteurs demeure inconnu. Il a également été montré que le système GAPDH-3PGK localisé au niveau des vésicules synaptiques glutamatergiques contribue à maintenir un apport constant d'ATP à la pompe H^+ -ATPase (Ikemoto et coll., 2003). Ce système recycle l'ADP en ATP via la glycolyse, grâce à la conversion du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-bisphosphoglycérate, aux dépens du NAD et du P_i , catalysée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) associée aux vésicules. Le produit de cette réaction transfère ensuite la haute énergie de sa liaison phosphate à l'ADP, grâce à l'activité 3-PGK (en anglais « *GAPDH-bound 3-phosphoglycerate kinase* »).

Les neurones cortico-striataux présentent une activité électrique spontanée (Cowan & Wilson, 1994). Leur dépolarisation génère un potentiel d'action biphasique, composé d'une phase initiale positive suivie d'une phase négative plus longue. La propagation de ce potentiel d'action dans la terminaison conduit à une libération massive de glutamate dans la fente synaptique (*pour revue* : Hertz, 2006). Cette libération s'effectue à partir des vésicules des terminaisons, selon un mécanisme dépendant du calcium et impliquant des canaux ioniques voltage-dépendants de type N et P/Q. Récemment, un mécanisme similaire de libération a été mis en évidence au niveau des cellules gliales, qui expriment une machinerie exocytotique identique à celle des neurones (*pour revue* : Voltera & Meldolesi, 2005). Un nombre croissant d'études suggère en effet que les cellules gliales sont capables de libérer du glutamate au niveau

extracellulaire, suivant six mécanismes distincts (*pour revue* : Malarkey & Parpura, 2007 ; Figure 9) :

- une libération calcium-dépendante ;
- une inversion du sens de la capture opérée par les transporteurs plasmiques gliaux ;
- un efflux résultant du fonctionnement de l'échangeur cystine-glutamate (X_c^-) ;
- une libération via les récepteurs purinergiques ionotropiques P2X7 ;
- une ouverture de canaux anioniques induite par gonflement cellulaire ;
- une libération via des « héli-canaux » correspondant à des « héli-jonctions GAP » fonctionnelles.

Ces données concernant les cellules gliales s'opposent à la conception selon laquelle le glutamate ne pourrait être libéré à partir de vésicules qu'au niveau des neurones et, à l'inverse, selon un mécanisme n'impliquant pas les vésicules en ce qui concerne les cellules gliales (*pour revue* : Danbolt, 2001).

1.2.1.3 RECAPTURE

Les systèmes de capture du glutamate jouent un rôle important dans l'inactivation de ce neurotransmetteur au niveau synaptique, notamment en raison de son caractère excitotoxique. En effet, de nombreuses études, *in vitro* et *in vivo*, ont démontré que l'invalidation transgénique, la répression antisens ou l'inhibition pharmacologique des transporteurs du glutamate provoquent un accroissement des taux extracellulaires de glutamate à l'origine d'une toxicité neuronale.

On dénombre actuellement cinq familles de transporteurs des acides aminés excitateurs (en anglais « *excitatory amino acid transporters* », EAAT) : EAAT1 à EAAT5 selon la nomenclature utilisée chez l'Homme. Ces transporteurs, différents des transporteurs exprimés

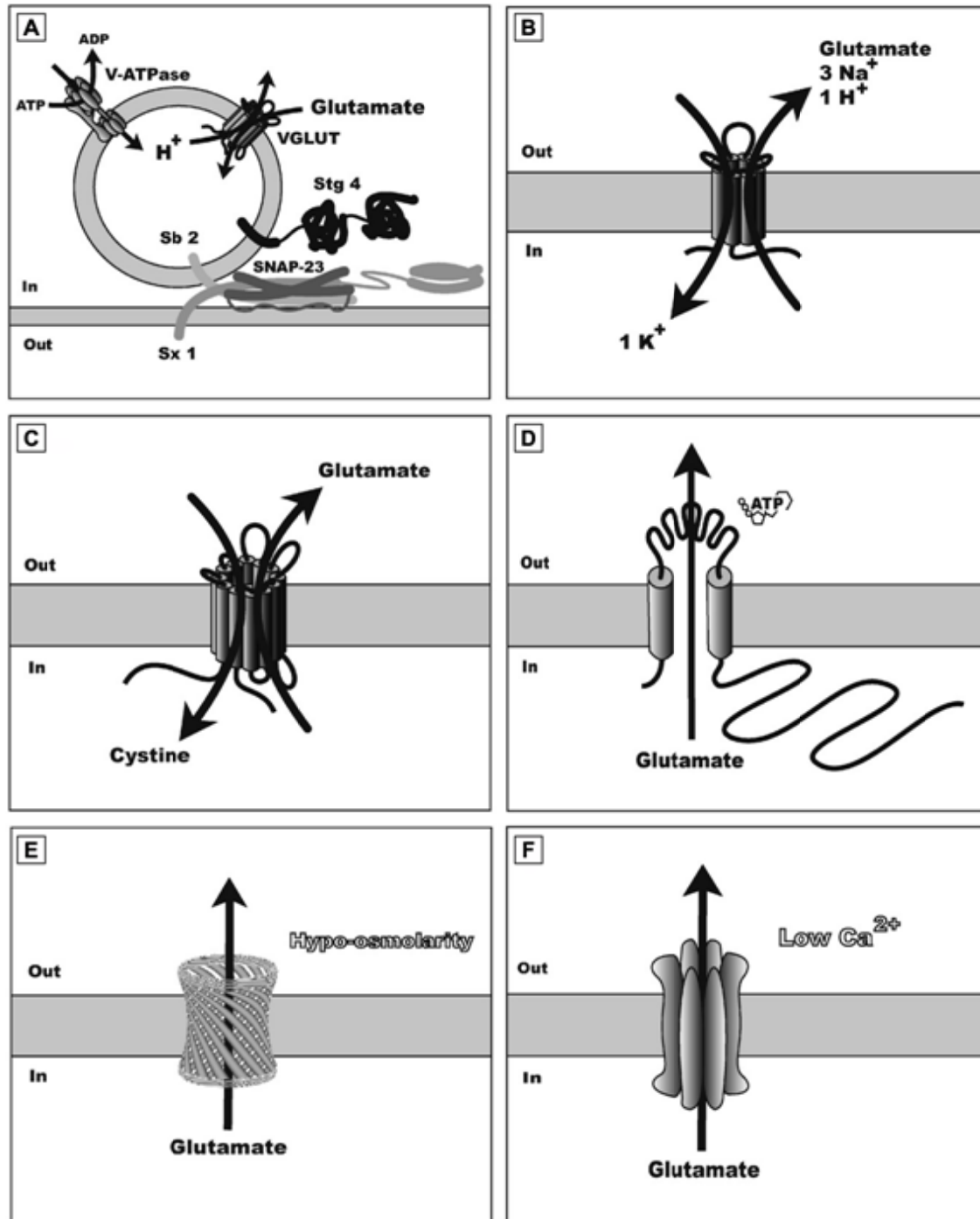


Figure 9 : Représentation schématique des différents mécanismes de libération de glutamate à partir des cellules gliales.

(A) Exocytose dépendante du Ca²⁺ ; (B) Capture inverse opérée par les transporteurs gliaux du glutamate ; (C) Efflux de glutamate via l'échangeur cystine-glutamate ; (D) Libération via les récepteurs purinergiques ionotropiques ; (E) Ouverture de canaux ioniques anioniques résultant d'un gonflement cellulaire ; (F) Libération via des « hémicanaux ». *Abréviations* : Sb 2, synaptobrévine 2 ; SNAP-23, protéine associée aux synaptosomes de 23 kDa ; Stg 4, synaptotagmine 4 ; Sx 1, syntaxine 1 ; V-ATPase, ATPase-H⁺ de type vésiculaire ; VGLUT, transporteur vésiculaire du glutamate (d'après Malarkey & Parpura, 2007).

au niveau vésiculaire, le sont tant sur le plan de leur expression régionale et cellulaire que sur celui de leurs caractéristiques moléculaires et pharmacologiques. Le transporteur EAAT1 (équivalent à GLAST chez le Rat) est relativement ubiquiste et préférentiellement exprimé au niveau des cellules gliales (*pour revues* : Danbolt, 2001 ; Kanai & Hediger, 2004 ; Beart & O'Shea, 2007). EAAT2 (GLT1 chez le Rat), dont l'expression cérébrale est diffuse et très abondante, est en revanche presque exclusivement glial. Les transporteurs EAAT3 (EAAC1 chez le Rat) et EAAT4 sont, au contraire, majoritairement exprimés au niveau neuronal. EAAT3 est distribué de manière assez large dans l'ensemble du système nerveux central alors qu'EAAT4 est principalement exprimé dans le cervelet par les cellules de Purkinje. EAAT5 est, quant à lui, essentiellement localisé au niveau des cellules bipolaires et photoréceptrices de la rétine (*pour revues* : Danbolt, 2001 ; Kanai & Hediger, 2004 ; Beart & O'Shea, 2007). Des données fonctionnelles ont confirmé la prédominance des cellules gliales dans le transport du glutamate (*pour revue* : Danbolt, 2001) qui, outre l'intérêt physiologique que représente la prévention des effets extracellulaires toxiques du glutamate, permet d'entretenir le cycle glutamate-glutamine, constituant un processus métabolique essentiel du système nerveux central. Bien qu'elle soit suspectée depuis plus de 30 ans, l'existence de transporteurs glutamatergiques localisés au niveau présynaptique n'est pas encore clairement démontrée. Des données récentes suggèrent néanmoins qu'une forme variante d'EAAT2 pourrait être responsable de la capture présynaptique du glutamate au niveau du cortex, du thalamus et de l'hippocampe (Schmitt et coll., 2002 ; Chen et coll., 2002 ; Chen et coll., 2004). La difficulté à démontrer l'existence de systèmes de transport présynaptiques pourrait résulter de la faible expression de ces transporteurs en regard de ceux exprimés au niveau glial. Néanmoins, l'étroite cohésion existant entre les cellules gliales et les terminaisons glutamatergiques pourrait également limiter les capacités d'accès des anticorps utilisés dans les études immunohistologiques. Concernant plus particulièrement le striatum, les isoformes GLT1a et GLT1b

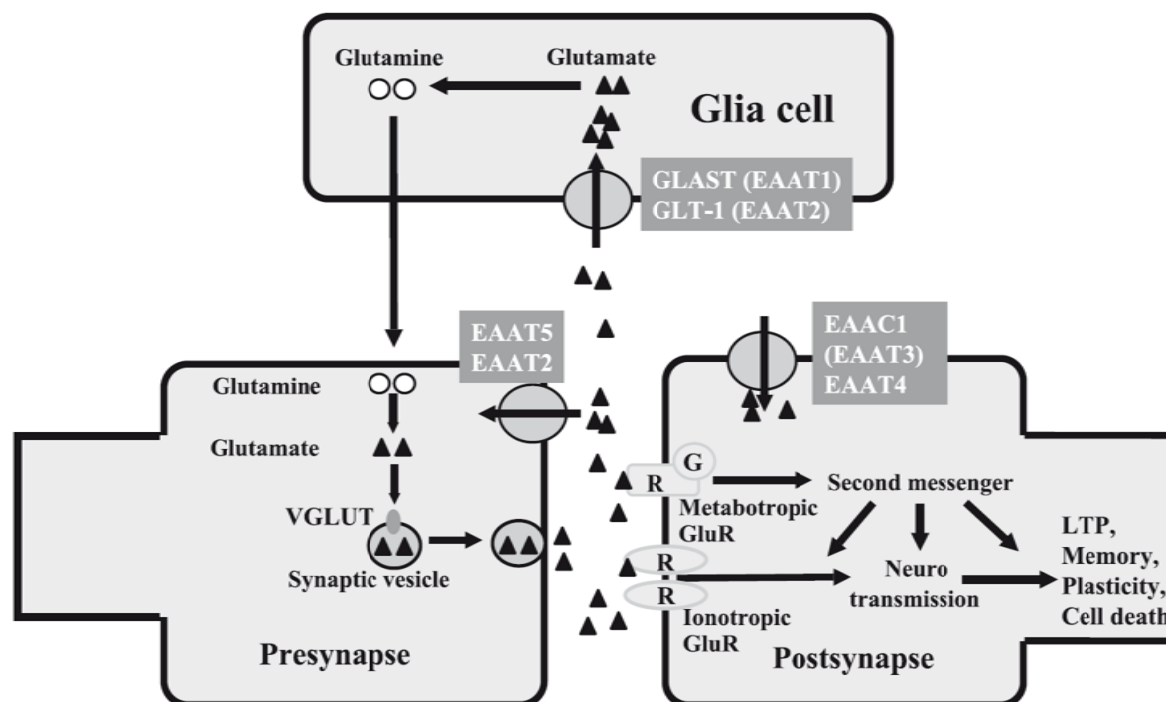


Figure 10 : Représentation schématique de la transmission du signal glutamatergique et des systèmes de recapture du glutamate.

EAAT5 est essentiellement exprimé dans la rétine et la présence d'EAAT2 au niveau présynaptique dans le striatum reste hypothétique. *Abréviations* : LPT, potentialisation à long terme (d'après Shigeri et coll., 2004).

ont été identifiées en relativement grandes quantités chez le Rat (Chen et coll., 2002 ; Lauriat et coll., 2007) mais leur localisation présynaptique reste néanmoins à établir (Figure 10). D'un point de vue pharmacologique, il est communément admis que le transport de glutamate nécessite le co-transport de trois ions Na^+ et d'un ion H^+ , accompagné d'une sortie d'un ion K^+ pour permettre le maintien d'un large gradient de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique (*pour revues* : Danbolt, 2001 ; Kanai & Hediger, 2004 ; Shigeri et coll., 2004). Sur la base de cette stœchiométrie, il a été calculé que les transporteurs du glutamate sont capables, dans les conditions physiologiques, d'augmenter la concentration intracellulaire de glutamate de 5×10^6 fois (Zerangue & Kavanaugh, 1996), indiquant que ces mécanismes sont particulièrement performants. Enfin, il existe de nombreux inhibiteurs des transporteurs du glutamate, parmi lesquels plusieurs dérivés du glutamate lui-même et certains agonistes glutamatergiques, comme le *thréo*-3-méthylglutamate ou l'acide

dihydrokaïnique. Ces composés présentent évidemment l'inconvénient d'être des agonistes des récepteurs glutamatergiques et sont donc relativement peu exploités expérimentalement. Parmi les autres outils pharmacologiques disponibles, l'acide *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylique (PDC), qui agit comme substrat compétitif d'EAAT1 à EAAT4 et comme inhibiteur d'EAAT5, est de loin le plus couramment utilisé. En présentant également peu d'affinité pour les récepteurs glutamatergiques, le *DL-thréo*- β -benzyloxyaspartate (DL-TBOA), un analogue de l'aspartate, présente, à l'inverse du PDC, la propriété d'inhiber la capture de glutamate en bloquant le transporteur. Enfin, bien que possédant une moins bonne affinité pour les transporteurs du glutamate (K_i de l'ordre de 200 μ M contre quelques dizaines de μ M pour le PDC ou le TBOA), l'acide *L*- α -aminoadipique (*L*- α AA) présente néanmoins la particularité d'inhiber à la fois la capture gliale de glutamate et l'échange cystine/glutamate. Il est, en outre, toxique pour les cellules gliales (Pow, 2001).

1.2.1.4 RÉCEPTEURS ET MÉCANISMES DE TRANSDUCTION

Il existe deux grandes familles distinctes de récepteurs glutamatergiques : les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques (*pour revues* : Danbolt, 2001 ; Kew & Kemp, 2005 ; Ferraguti & Shigemoto, 2006, Figure 11).

a) Les récepteurs glutamatergiques ionotropiques

Les récepteurs glutamatergiques de type ionotropique correspondent en fait à des canaux ioniques dont l'ouverture, commandée par la liaison du ligand, provoque une entrée massive de cations dans la cellule réceptrice, générant des réponses cellulaires très rapides, mesurables sous la forme de potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE). Les effets induits par les récepteurs ionotropiques ne sont cependant pas restreints à ces seules réponses

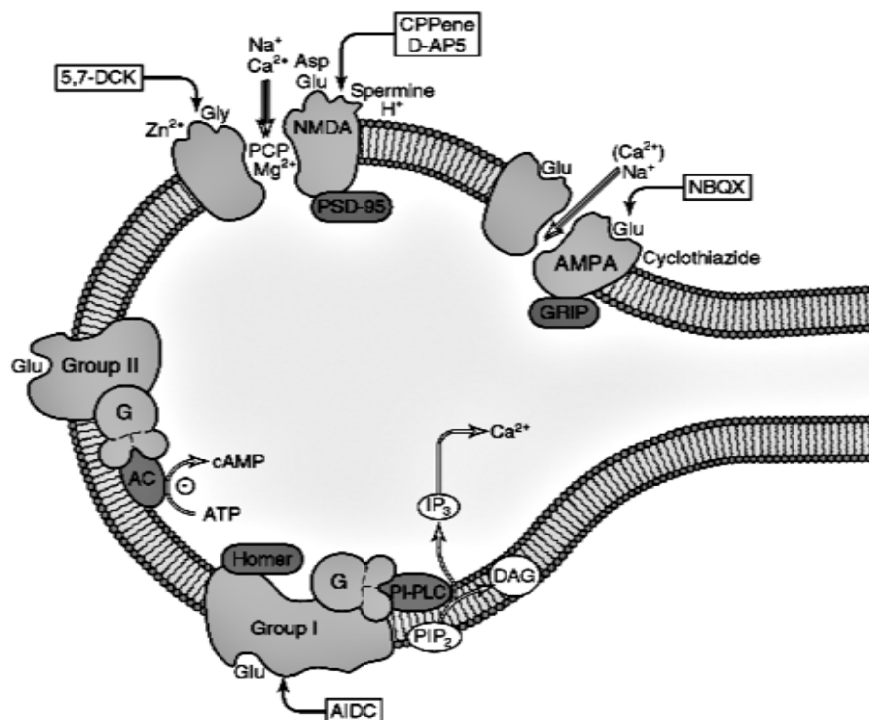


Figure 11 : Les récepteurs glutamatergiques.

Représentation schématique du mode de fonctionnement des récepteurs ionotropiques de type NMDA et AMPA ainsi que des récepteurs métabotropiques de type I et III (d'après « *Basic Neurochemistry : Molecular, Cellular and Medical Aspects* » 6th Ed., American Society for Neurochemistry, Lippincott Williams and Wilkins, 1999).

postsynaptiques rapides, puisqu'ils incluent également des actions au niveau présynaptique et peuvent, en outre, induire des modifications à long terme de l'activité synaptique. Il existe trois classes de récepteurs ionotropiques glutamatergiques, identifiés grâce à des approches pharmacologiques qui sont à l'origine de leur classification et de leur dénomination. On différencie ainsi les récepteurs NMDA des récepteurs AMPA et KA.

Les **récepteurs AMPA**, sélectivement activés par l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), sont responsables des effets excitateurs les plus rapides de la transmission glutamatergique du système nerveux des mammifères. Ils sont virtuellement présents dans tous les neurones du système nerveux central (Tzschentke, 2002). L'affinité des récepteurs AMPA pour le L-glutamate, le ligand endogène de ces récepteurs, est plus faible que celle présentée par les récepteurs ionotropiques de type NMDA (*pour revue* : Dingledine

et coll., 1999). Les canaux ioniques constitutifs de ces récepteurs, rapidement activables ou inactivables, s'ouvrent brusquement mais très brièvement. Ces canaux sont perméables aux cations monovalents représentés par le Na^+ et le K^+ . Cependant, sous certaines conditions, les récepteurs AMPA peuvent également être perméables aux ions Ca^{2+} (Figure 11). Des techniques de biologie moléculaire ont révélé que ces récepteurs sont composés de quatre sous-unités (GluR1 à GluR4), codées par des gènes distincts et supposées s'organiser fonctionnellement en tétramères hétéromériques (*pour revue* : Kew & Kemp, 2005). Les différentes possibilités de combinaison résultant de cet agencement hétérotétramérique du récepteur AMPA et du canal ionique qui lui est associé sont à l'origine d'une diversité qui influence fortement les propriétés du canal. La sous-unité GluR2 apparaît ainsi jouer un rôle déterminant dans la perméabilité du canal aux ions Ca^{2+} . En effet, les récepteurs n'exprimant pas cette sous-unité sont perméables au calcium et soumis à de forts courants de rectification entrante. De tels récepteurs, dépourvus de sous-unité GluR2 et perméables au Ca^{2+} , ont été identifiés dans l'hippocampe et l'amygdale, au niveau d'interneurones inhibiteurs, alors que les cellules pyramidales sont, en revanche, principalement pourvues de récepteurs AMPA imperméables au Ca^{2+} (*pour revue* : Dingledine et coll., 1999). Au niveau striatal, les sous-unités GluR1 et GluR2 sont les plus fréquemment représentées (Stefani et coll., 1998). Très récemment, il a été mis en évidence que les sous-unités GluR2 sont exprimées en plus grande quantité au niveau des neurones striataux efférents alors que les sous-unités GluR1 sont plus abondantes au niveau des interneurones comportant de la parvalbumine. Néanmoins, la proportion de ces deux sous-unités au niveau des neurones striataux efférents semble être en faveur de GluR1 pour ce qui concerne les projections de la voie indirecte, alors que GluR2 serait préférentiellement exprimé par ceux de la voie directe (Deng et coll., 2007).

Les **récepteurs KA** sont sélectivement activés par l'acide kaïnique. Ces récepteurs sont associés à un canal ionique, principalement perméable aux cations monovalents, Na^+ et K^+ ,

	Récepteurs ionotropiques			Récepteurs métabotropiques
	NMDA	AMPA	Kainate	mGLUR
Caractéristiques fonctionnelles	Activation de canaux Na ⁺ , K ⁺ et Ca ²⁺	Activation de canaux Na ⁺ et K ⁺	Activation de canaux Na ⁺ et K ⁺	Activation de la PLC, inhibition de l'adénylyl cyclase
Agonistes	NMDA, iboténate, quinolinate	AMPA, quisqualate, kainate, domoate	Kainate, domoate, acides acroméliques A et B	Quisqualate, L-AP4, L-sérine-O-phosphate, iboténate
Antagonistes compétitifs	2-AP5, 2-AP7, CPP, CGP39653	CNQX, NBQX, DNQX	GAMS, glutamyl-glycine	analogues de la phénylglycine (3HPG, 4CPG, 4C3HPG)
Modulateurs allostériques	glycine, D-sérine, spermine	Benzothiazide	Concanavaline A (Con A)	
Antagonistes des sites allostériques	5,7-diCl-Kyn, HA-966, CNQX			
Inhibiteurs du canal ionique	PCP, MK-801, kétamine	Toxine d'araignée Joro (JST)		

Table 2 : Principales caractéristiques pharmacologiques des récepteurs glutamatergiques.

D'après « *Neurotransmitters and Neuromodulator* » 2nd Ed, von Bohlen und Halbach & Dermietzel, Wiley-VCH, 2006.

ainsi qu'au Ca²⁺ dans une moindre mesure. Le mode de fonctionnement exact des récepteurs KA reste, en revanche, relativement méconnu par manque d'outils pharmacologiques permettant de les étudier sélectivement. Il n'existe, en effet, aucun antagoniste sélectif des récepteurs KA, qui ont d'ailleurs été longtemps confondus avec les récepteurs AMPA, avec lesquels ils étaient généralement regroupés sous l'appellation de « récepteurs non NMDA » ou récepteurs « AMPA/KA » (Table 2). Les techniques de biologie moléculaire ont indiqué que le récepteur KA est formé de quatre sous-unités réparties en deux familles distinctes : la famille des sous-unités GluR5 à GluR7 et celle des sous-unités KA1 et KA2. Contrairement aux récepteurs AMPA, les récepteurs KA peuvent être composés de tétramères, sur un mode hétéromérique ou homomérique. Néanmoins, les homotétramères composés uniquement de sous-unités KA1 ou KA2 ne sont pas fonctionnels. Les récepteurs KA sont largement

distribués dans le système nerveux central, avec un haut niveau d'expression dans les structures frontales (*pour revue* : Dingledine et coll., 1999). Les techniques d'hybridation *in situ* indiquent, en revanche, que les ARNm codant les différentes sous-unités composant ces récepteurs présentent une expression cérébrale très régionalisée. En effet, la sous-unité GluR5 est majoritairement exprimée au niveau des interneurons de l'hippocampe, où elle semble impliquée dans des mécanismes de signalisation neuronale induits par la libération gliale de glutamate (Liu et coll., 2004). La sous-unité GluR5 est aussi fortement exprimée au niveau du lobe temporal et les études pharmacologiques ont déterminé que, dans l'amygdale, les récepteurs KA pourvus de ces sous-unités pourraient être impliqués dans l'activité synaptique et dans les processus épileptogènes (Rogawski et coll., 2003). Outre ces effets post-synaptiques, il est généralement considéré que les récepteurs KA ont principalement une localisation présynaptique (*pour revue* : Lerma, 2003). Dans l'hippocampe, il a, par exemple, été mis en évidence qu'une stimulation répétitive accroît la libération de glutamate à partir des fibres moussues, selon un mécanisme résultant de l'activation de récepteurs KA présynaptiques, qui agissent ainsi en tant qu'auto-récepteurs excitateurs et pourraient être impliqués dans les mécanismes de plasticité à court terme caractéristiques de ces fibres (Schmitz et coll., 2001). En outre, comme cela a déjà été démontré dans l'hippocampe (Clarke et coll., 1997) et la SNc (Nakamura et coll., 2003a), une étude très récente, menée chez le Rat, indique que les récepteurs KA présynaptiques, localisés au niveau des terminaisons des neurones striato-pallidaires, inhibent la libération de GABA à partir de ces neurones (Jin et coll., 2007), selon un mécanisme dépendant de la protéine kinase de type C (PKC). Cet effet présynaptique pourrait avoir des implications thérapeutiques dans le contexte de la maladie de Parkinson, en réprimant l'hyperactivité de la voie indirecte.

Les **récepteurs NMDA**, essentiellement post-synaptiques, sont sélectivement activés par le N-méthyl-D-aspartate. Ils constituent les récepteurs ionotropiques les plus abondants chez les

mammifères. Ces récepteurs jouent un rôle important dans la transmission glutamatergique rapide, ainsi que dans les processus de synaptogenèse. Au potentiel de repos de la membrane, les récepteurs NMDA sont inactifs et le canal ionique est obstrué par un ion Mg^{2+} (Figure 11). Lorsque la membrane est dépolarisée, l'ion magnésium est libéré et le canal permet alors l'entrée massive de cations dans la cellule. Le canal associé au récepteur NMDA est perméable aux cations bi- et monovalents : Ca^{2+} , Na^{+} et K^{+} . Les récepteurs NMDA manifestent en outre une plus forte affinité pour le glutamate que les récepteurs AMPA. Les canaux auxquels ils sont associés s'ouvrent plus tardivement mais restent ouverts plus longtemps, provoquant une entrée massive de calcium dans la cellule. Une conséquence essentielle de cette entrée massive d'ions calciques dans la cellule est l'activation de nombreux processus modifiant les propriétés neuronales, qui incluent des mécanismes de transduction intracellulaire. Cependant, un excès de calcium dans les cellules peut également leur être néfaste (*pour revue* : MacDonald et coll., 2006) et les propriétés excitotoxiques induites par une hyperactivation des récepteurs NMDA, ou des récepteurs KA qui partagent ces propriétés délétères, ont été souvent interprétées comme résultant d'une mort cellulaire liée au calcium. Cette interprétation apparaît néanmoins simpliste puisque des augmentations prolongées de la concentration intracellulaire de calcium ne sont pas toxiques lorsqu'elles sont induites par d'autres récepteurs ou canaux ioniques (*pour revue* : Lynch & Guttman, 2002). Comme les récepteurs AMPA et KA, les récepteurs NMDA sont constitués de sept sous-unités différentes. Ces sous-unités sont réparties en trois familles : NR1, NR2 (NR2A à NR2D) et NR3 (NR3A et NR3B) (*pour revue* : Kew & Kemp, 2005). Bien que produite à partir d'un seul gène, la sous-unité NR1 présente huit formes distinctes et fonctionnelles de variants d'épissage (*pour revue* : McBain & Mayer, 1994). Les complexes fonctionnels sont par nature hétéromériques et apparaissent constitués d'une sous-unité NR1, d'au moins une sous-unité NR2, ou d'une combinaison comprenant une sous-unité NR1 et au moins une sous-

unité de type NR2 et NR3, la sous-unité NR3 ne pouvant former un récepteur fonctionnel en l'absence de NR1 et NR2. La présence de la sous-unité NR3 dans les combinaisons hétéromériques fonctionnelles (NR1/NR2/NR3), dont l'expression cérébrale est démontrée (Al-Hallaq et coll., 2002), abolit la conductance unitaire du canal associé au récepteur NMDA et supprime sa perméabilité aux ions Ca^{2+} (*pour revue* : Kew & Kemp, 2005). L'agencement de ces sous-unités en complexes pentamériques a été initialement envisagé, mais des études plus récentes privilégient l'hypothèse d'une organisation tétramérique (*pour revues* : Dingledine et coll., 1999 ; Kew & Kemp, 2005). En raison de sa présence obligatoire dans les complexes hétéromériques fonctionnels, la sous-unité NR1 présente une distribution large et diffuse dans tout le système nerveux central. En revanche, les sous-unités NR2 et NR3 sont exprimées selon des profils spatio-temporels distincts. Chez l'Homme et le rongeur, NR2A et NR2B prédominent dans les structures rostrales. La sous-unité NR2C présente, en revanche, une distribution plus régionale (focalisant les cellules granulaires du cervelet et quelques autres noyaux) et son expression est prépondérante durant le développement. L'expression des sous-unités NR3A est également prédominante au cours du développement, bien qu'elle persiste au niveau de certaines populations neuronales matures. L'expression de NR3B est, quant à elle, limitée aux motoneurones somatiques du tronc cérébral et de la moelle épinière (*pour revues* : Dingledine et coll., 1999 ; Lynch & Guttman, 2002 ; Kew & Kemp, 2005). D'un point de vue fonctionnel, le récepteur NMDA se distingue des autres récepteurs ionotropiques en raison du fait que son activation requiert la liaison de deux agonistes différents, la glycine et le glutamate, dont les sites sont respectivement portés par les sous-unités NR1 et NR2. Les données électrophysiologiques ont, en outre, démontré que deux molécules de chacun de ces ligands seraient nécessaires pour activer le récepteur NMDA, favorisant par ailleurs l'hypothèse d'une organisation tétramérique composée de deux sous-unités NR1 et de deux sous-unités NR2 (*pour revues* : Dingledine et coll., 1999 ; Kew &

Kemp, 2005). Les principaux outils pharmacologiques spécifiques des récepteurs NMDA sont présentés dans la Table 2.

b) Les récepteurs glutamatergiques métabotropiques

Les récepteurs glutamatergiques de type métabotropique appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). On dénombre actuellement huit récepteurs glutamatergiques métabotropiques différents, mGluR1 à mGluR8, qui ont été répartis en trois groupes selon des critères d'homologie de séquence, de couplage et de comportement pharmacologique : le groupe I (mGluR1 et mGluR5), le groupe II (mGluR2 et mGluR3) et le groupe III (mGluR4 et mGluR6 à mGluR8). Ces récepteurs sont constitués d'homodimères qui nécessitent la fixation de deux molécules de ligand pour une activation complète (*pour revue* : Palucha & Pilc, 2007).

Les **récepteurs métabotropiques de type I** sont préférentiellement couplés à la phospholipase de type C (PLC) via des protéines G de type $G_{q/11}$ et leur activation stimule l'hydrolyse des phospho-inositides. Ces récepteurs sont également capables de dépolariser les neurones en inhibant la conductance au potassium ou en inhibant des canaux K^+ de type M. Certaines études indiquent également que l'activation des récepteurs métabotropiques de type I stimule l'adénylyl cyclase (*pour revues* : Kew & Kemp, 2005 ; Palucha & Pilc, 2007). Ces récepteurs ont une localisation principalement post-synaptique où ils sont associés à la famille des protéines Homer (Figure 11A). Ces protéines d'échafaudage, localisées au niveau de la densité post-synaptique, présentent à la fois des sites de liaison aux récepteurs glutamatergiques métabotropiques de type I, aux récepteurs glutamatergiques de type NMDA, aux canaux calciques ou encore aux récepteurs de l' IP_3 (*pour revue* : Ehrenguber et coll., 2004). Elles pourraient donc être particulièrement impliquées dans la transmission du signal

glutamatergique. En ce qui concerne leur répartition, les récepteurs mGluR1 sont largement distribués dans le cerveau adulte alors que les récepteurs mGluR5 sont principalement localisés au niveau de structures associées au système limbique (hippocampe, amygdale, noyau accumbens) ainsi que dans le cervelet, les ganglions de la base ou le tubercule olfactif (*pour revue* : Spooren et coll., 2003). Au niveau striatal, mGluR1 et mGluR5 sont localisés au niveau des neurones épineux de taille moyenne GABAergiques ainsi qu'au niveau de tous les interneurons (Gubellini et coll., 2004). Au niveau des neurones épineux, il a été mis en évidence que mGluR5 amplifie les courants induits par les récepteurs NMDA (Mannaioni et coll., 2001 ; Pisani et coll., 2001). En retour, le récepteur NMDA apparaît également potentialiser les récepteurs mGluR5 exprimés par ces cellules, en inhibant leur désensibilisation (Alagarsamy et coll., 1999). Enfin, il a été montré que l'activation combinée des récepteurs mGluR5 et NMDA localisés au niveau des neurones épineux est capable d'activer l'expression de gènes via une phosphorylation rapide et transitoire de facteurs de transcriptions résultant de l'activation de la voie des MAP-kinases (Mao & Wang, 2003). Enfin, l'activation des récepteurs mGluR1 et mGluR5 semble également moduler les réponses synaptiques induites au niveau des neurones épineux par la dopamine, en amplifiant la signalisation opérée par le récepteur D₁ (*pour revue* : Conn et coll., 2005).

Les **récepteurs métabotropiques de type II** (mGluR2 et mGluR3) sont, à l'instar des récepteurs du groupe I, fortement exprimés au niveau du cortex préfrontal, de l'amygdale et de l'hippocampe, des structures généralement associées au système limbique contrôlant les émotions (*pour revue* : Palucha & Pilc, 2007). En revanche, ces récepteurs sont principalement localisés de manière présynaptique, au niveau des terminaisons glutamatergiques où ils assurent un rôle d'autorécepteurs. Ces récepteurs sont couplés négativement à l'adénylyl cyclase (Figure 11A) et leur stimulation provoque une inhibition de la libération de glutamate, en particulier lorsque les concentrations synaptiques de glutamate

sont excessives (Schoepp, 2001). Certains récepteurs métabotropiques du groupe II ont également été identifiés au niveau post-synaptique où ils inhibent plusieurs types de canaux ioniques (calciques et potassiques notamment). Ils pourraient, par conséquent, être impliqués dans la régulation de l'excitabilité neuronale (*pour revue* : Pin & Duvoisin, 1995). Les récepteurs mGluR3 sont, en outre, largement exprimés au niveau des cellules gliales et il a récemment été mis en évidence que leur activation y stimule la capture de glutamate (Yao et coll., 2005). Au niveau striatal, les récepteurs mGluR2 et mGluR3 sont localisés au niveau des terminaisons cortico-striatales où ils inhibent la libération de glutamate et au niveau des terminaisons nigro-striatales où ils pourraient inhiber la libération de dopamine (*pour revue* : Conn et coll., 2005).

Les **récepteurs métabotropiques de type III** (mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8) sont couplés négativement à l'adénylyl cyclase, leur stimulation inhibant, par conséquent, la formation d'AMPc. À l'exception du sous-type mGluR6, dont l'expression est restreinte à la rétine, tous les autres récepteurs de type III sont représentés de manière relativement diffuse dans la plupart des régions du système nerveux central. En outre, les récepteurs métabotropiques de type III sont à la fois exprimés par les neurones et les cellules gliales. Contrairement aux autres sous-types de récepteurs métabotropiques de type III, qui sont localisés de manière périssynaptique, il semble que mGluR7 soit présent au centre de la zone présynaptique (Shigemoto et coll., 1996). Le récepteur mGluR7 est ainsi considéré comme le principal autorécepteur modulant, dans les conditions physiologiques normales, la libération de glutamate (*pour revue* : Schoepp, 2001). Au niveau des ganglions de la base, il a été mis en évidence que mGluR4 et mGluR7 sont localisés présynaptiquement et qu'ils inhibent la libération de glutamate et de GABA (*pour revue* : Conn et coll., 2005). Cette inhibition présynaptique de la libération de GABA est notamment démontrée au niveau des terminaisons striato-pallidales (Valenti et coll., 2003).

1.2.2 LA DOPAMINE

Bien que la dopamine (3,4-dihydroxyphényléthylamine) ait été synthétisée pour la première fois en 1910, il fallut attendre le milieu des années 1950 pour que commence à émerger l'idée que cette substance pourrait avoir une autre importance que le simple statut d'intermédiaire dans la formation de noradrénaline. Cependant, ce n'est qu'à la fin des années 1950 que sa distribution cérébrale fut distinctement différenciée de celle de la noradrénaline (Bertler & Rosengren, 1959) et que son rôle de neurotransmetteur et son implication dans la maladie de Parkinson commencèrent à être évoqués (Carlsson, 1959). Durant les deux décennies suivantes, les études pharmacologiques ont contribué à imposer progressivement son statut de neurotransmetteur et à mettre en évidence ses importantes fonctions physiologiques et comportementales. L'existence de récepteurs spécifiques ne fut, en revanche, démontrée sur une base moléculaire que durant les années 1980 (*pour revue* : Marsden, 2006). La dopamine est présente dans plusieurs régions cérébrales, mais son expression prédomine nettement dans le striatum qui reçoit une forte innervation de la substance noire et joue un rôle essentiel dans la coordination des mouvements corporels. D'un point de vue anatomique, les systèmes dopaminergiques peuvent être répartis en trois catégories distinctes se différenciant selon la taille des projections axonales (Figure 12) :

- les projections « ultra-courtes », qui incluent les cellules amacrines de la rétine et les cellules périglomérulaires du bulbe olfactif, sont caractérisées par de très petites extensions dendritiques intralaminaires ;
- les projections courtes comprennent trois sous-systèmes représentés par (1) les cellules dopaminergiques du noyau arqué hypothalamique (aire A12) qui se projettent vers l'hypophyse et l'éminence médiane, (2) les neurones intradiencéphaliques localisés dans l'hypothalamus postérieur (aire A11), la zona

incerta (aire A13) et à proximité du noyau paraventriculaire (aire A14) et (3) les neurones dopaminergiques présents dans le noyau du tractus solitaire et la substance

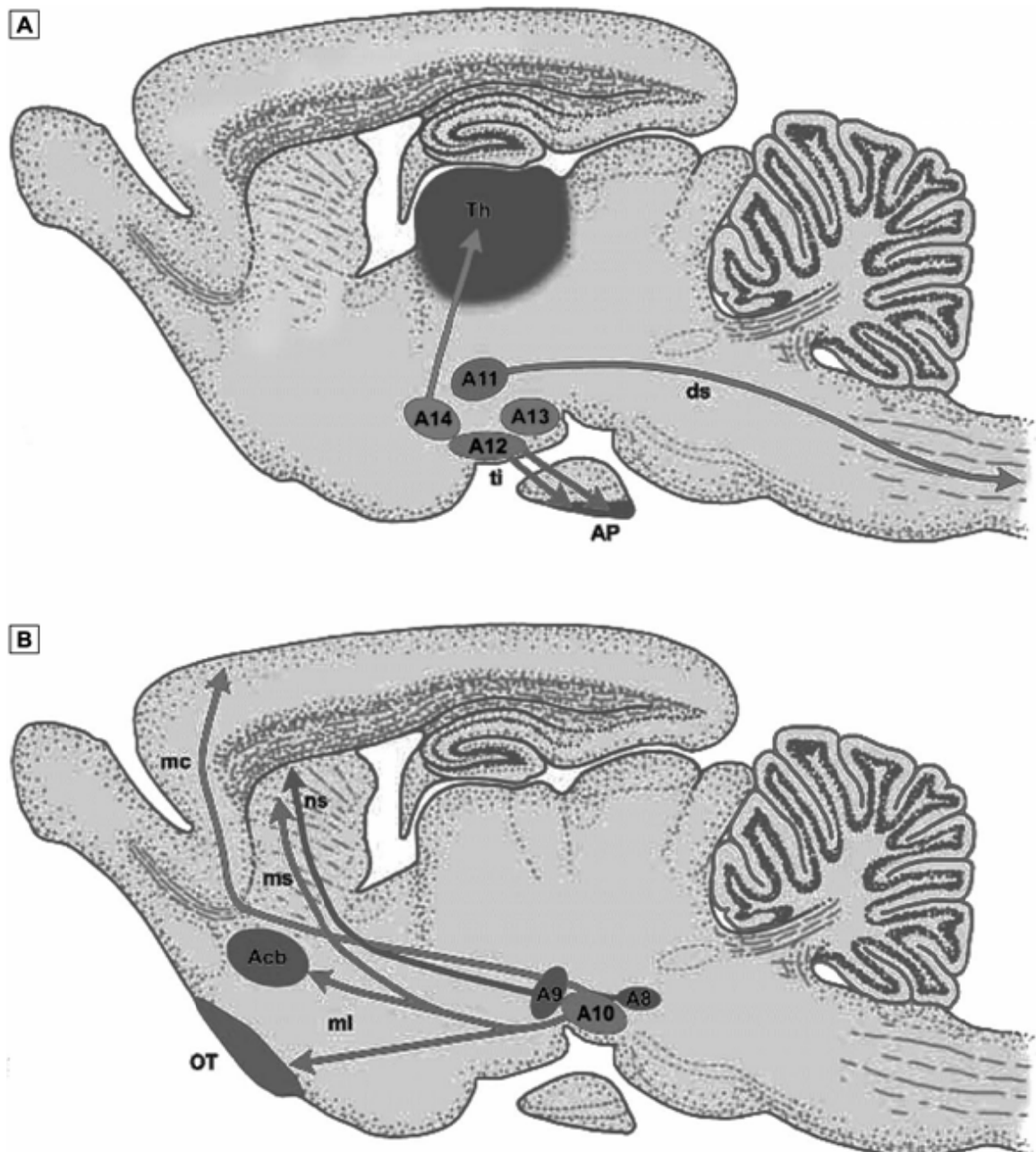


Figure 12 : Représentation schématique des principales voies dopaminergiques centrales chez le Rat.

(A) Neurones dopaminergiques à projections courtes. (B) Neurones dopaminergiques à projections longues. *Abréviations* : Acb, noyau accumbens ; ds, projections diencephalo-spinales ; mc, projections méso-corticales ; ml, projections méso-limbiques ; ns projections nigro-striatales ; OT, tubercule olfactif ; Th, thalamus (d'après « *Neurotransmitters and Neuromodulator* » 2nd Ed, von Bohlen und Halbach & Dermietzel, Wiley-VCH, 2006).

grise périaqueducale ;

- les projections longues originaires de l'aire rétro rubale (aire A8), de la substance noire (aire A9) et de la VTA (A10) et se projettent vers le néostriatum, le cortex limbique ainsi que vers certaines autres structures associées au système limbique (noyau accumbens, tubercules olfactifs, aire septale et amygdale).

En raison de son rôle essentiel dans la maladie de Parkinson, la dopamine occupe aujourd'hui une place majeure dans le domaine des neurosciences. En outre, elle est également importante dans la physiopathologie d'autres troubles psychiatriques, tels que la schizophrénie ou certaines formes de dépression, et apparaît impliquée dans les processus de récompense, de renforcement ou d'addiction.

1.2.2.1 BIOSYNTHÈSE

Comme les autres neurotransmetteurs, la dopamine ne peut franchir la barrière hémato-encéphalique. Néanmoins, certains précurseurs de sa synthèse, comme la phénylalanine et la tyrosine (qui peut être produite à partir de la phénylalanine grâce à l'activité enzymatique de la phénylalanine hydroxylase), ont cette faculté. La synthèse de dopamine s'effectue à l'intérieur du cytosol des neurones catécholaminergiques, principalement au niveau des terminaisons. Cette synthèse s'effectue à partir de la L-tyrosine et suivant deux étapes faisant appel à deux enzymes différentes, produites au niveau somatique et acheminées dans les terminaisons par transport axoplasmique (Figure 13) :

- la première résulte de l'action de la tyrosine hydroxylase qui permet la transformation de la L-tyrosine en L-DOPA (L-dihydroxy-3,4-phénylalanine) ;
- la seconde étape est caractérisée par la formation de dopamine à partir de la L-DOPA grâce à la DOPA décarboxylase.

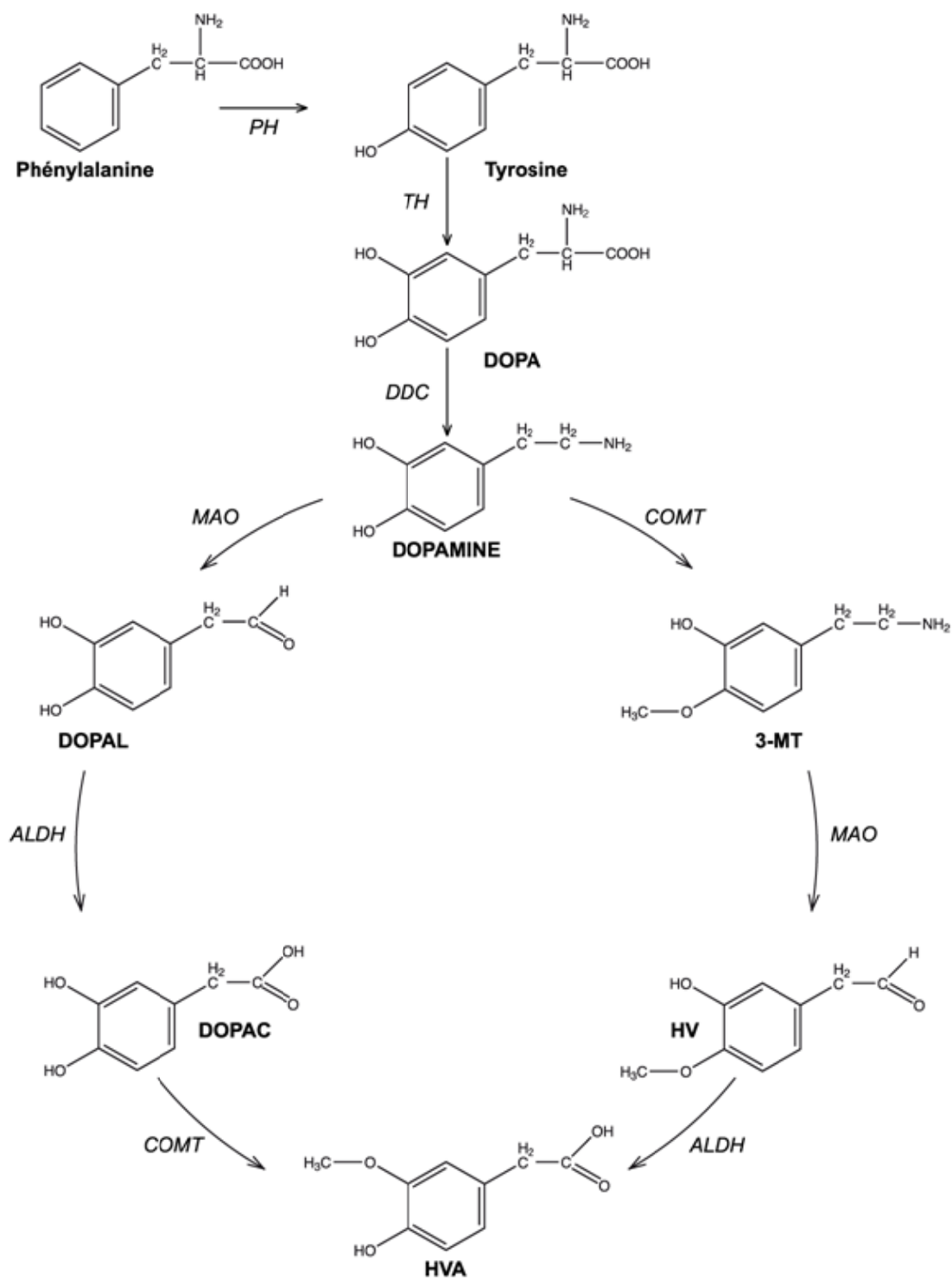


Figure 13 : Biosynthèse et métabolisme de la dopamine.

Abréviations : 3-MT, 3-méthoxytyramine ; ALDH, aldéhyde déshydrogénase ; COMT, catéchol-O-méthyltransférase ; DDC, dopa-décarboxylase ; DOPA, dihydroxyphénylalanine ; DOPAC, acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; DOPAL, 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde ; MAO, monoamine oxydase ; HV, homovanilline (3-méthoxy-4-hydroxyphénylacétaldéhyde) ; HVA: acide homovanillique ; PH, phénylalanine hydroxylase ; TH, tyrosine hydroxylase.

La tyrosine hydroxylase, qui est présente dans tous les neurones catécholaminergiques, constitue l'enzyme limitante de cette synthèse et contrôle ainsi la production de dopamine (Nagatsu et coll., 1964). Il semble en effet que, dans les conditions physiologiques, la tyrosine soit toujours en quantité suffisante pour saturer les sites actifs de l'enzyme qui opère toujours au maximum de son activité. Il a ainsi été mis en évidence que l'augmentation de la biodisponibilité en tyrosine n'accroît pas la production de dopamine. L'activité enzymatique de la tyrosine hydroxylase nécessite en outre la présence de tétrahydrobioptérine et d'oxygène comme co-facteurs. Les études initiales ont révélé que cette enzyme est inhibée par le produit final de la réaction (Spector et coll., 1967). De nombreux autres contrôles ont été par la suite mis en évidence, comme une phosphorylation rapide augmentant les capacités de synthèse de cette enzyme en cas d'activation neuronale prolongée (Iuvone et coll., 1982). Le produit catalytique de cette première étape, la L-DOPA, est ensuite décarboxylé grâce à la DOPA décarboxylase, une enzyme provoquant la décarboxylation de plusieurs autres acides aminés aromatiques. Cette enzyme n'étant pas limitante, l'augmentation de la disponibilité en L-DOPA augmente donc la synthèse de dopamine, principe sur lequel repose la L-DOPA thérapie employée dans le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson. Le bensérazide, un inhibiteur de cette réaction franchissant mal la barrière hémato-encéphalique, est associé au traitement par la L-DOPA afin de réduire la décarboxylation périphérique de cette dernière.

1.2.2.2 STOCKAGE VÉSICULAIRE ET LIBÉRATION

Une fois synthétisée dans le cytosol, la dopamine est stockée dans des vésicules qui la protègent alors de ses enzymes de dégradation (*cf.* chapitre suivant). Ce transporteur vésiculaire (en anglais « *vesicular monoamine transporteur* », VMAT), différent du transporteur localisé au niveau de la membrane plasmique, est capable de transporter la

dopamine, la sérotonine, la noradrénaline et l'histamine. Le gradient électrochimique de H^+ , généré de part et d'autre de la membrane vésiculaire par la triphosphatase adénosine/ H^+ cytosolique, est utilisé comme force motrice du transport. Deux isoformes distinctes de ce transporteur ont été mises en évidence pharmacologiquement puis clonées : VMAT1 et VMAT2 (Liu et coll., 1992 ; Erickson & Eiden, 1993). L'isoforme VMAT1 est principalement exprimée au niveau des cellules endocrines et paracrines aminergiques des organes périphériques. En revanche, VMAT2 prédomine dans les neurones monoaminergiques du système nerveux central, bien qu'il soit également exprimé par les cellules histaminergiques stomacales, les cellules chromaffines de la médullo-surrénale et les cellules sanguines. D'un point de vue pharmacologique, de nombreux substrats et inhibiteurs de VMAT2 ont été décrits (*pour revue* : Zheng et coll., 2006), notamment, en ce qui concerne les inhibiteurs, la réserpine, la tétrabénazine (Figure 14) ou le N-méthyl-4-phénylpyridinium. Néanmoins, le mode de fonctionnement de VMAT2 n'est pas encore précisément connu.

La dopamine est libérée dans l'espace synaptique sous l'effet de potentiels d'action provoquant son exocytose à partir des vésicules synaptiques. Cette libération dépend de la présence d'ions Ca^{2+} et de l'intensité de la dépolarisation. Les neurones dopaminergiques présentent deux modes d'activité électrique distincts (Grace & Bunney, 1984a, 1984b) : une activité tonique composée de dépolarisations uniques (en anglais « *single spike firing* ») et une activité composée de bouffées de potentiels d'action (en anglais « *burst firing* »). L'activité électrique tonique entretient la libération basale de dopamine au niveau striatal (Keefe et coll., 1993). Il a été mis en évidence dans plusieurs autres structures que l'activité phasique représentée par les bouffées de potentiels dépend de la stimulation exercée par la transmission glutamatergique (Floresco et coll., 2003). Les études utilisant des précurseurs radioactifs indiquent, de plus, que la libération de dopamine semble préférentiellement impliquer les stocks de dopamine nouvellement synthétisée. En outre, la dopamine peut

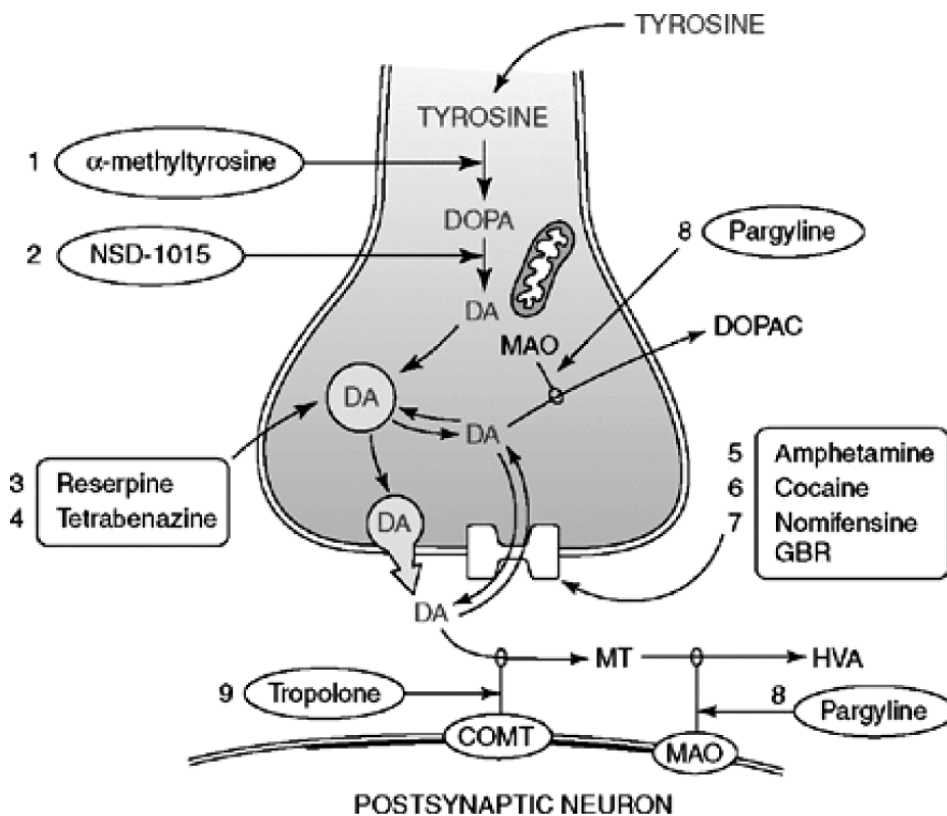


Figure 14 : Représentation schématique du métabolisme de la dopamine et de sa libération au niveau d'une terminaison dopaminergique chez le Rat.

Le schéma illustre la synthèse de la dopamine, son stockage vésiculaire, sa libération, sa recapture et sa dégradation. Les principaux outils pharmacologiques agissant à chacune de ces étapes sont également représentés : (1) l' α -méthyltyrosine, inhibiteur compétitif de la tyrosine hydroxylase ; (2) le NSD-1015, un inhibiteur de la DOPA décarboxylase ; (3) la réserpine qui inhibe irréversiblement le stockage vésiculaire de la dopamine ; (4) la tétrabénazine qui inhibe ce stockage de manière réversible ; (5) l'amphétamine qui augmente la concentration extracellulaire de dopamine en inhibant sa recapture et en stimulant sa libération ; (6) la cocaïne qui bloque également la capture de dopamine et favorise sa libération ; (7) la nomifensine et le GBR qui inhibent la capture de dopamine mais sans induire sa libération ; (8) les inhibiteurs des MAO comme, par exemple, la pargyline ; (9) la tropolone, un inhibiteur de la COMT. *Abréviations* : COMT, catéchol-O-méthyltransférase ; DA, dopamine ; DOPA, dihydroxyphénylalanine ; DOPAC, acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; HVA, acide homovanillique ; MAO, monoamine oxydase ; MT, 3-méthoxytyramine (d'après « *The biochemical Basis of Neuropharmacology* » 8th Ed., Cooper, Bloom & Roth, Oxford University Press, 2003).

également être libérée selon un processus non vésiculaire. Ce type de libération indépendante du Ca^{2+} s'effectue par le biais du transporteur membranaire de la dopamine qui assure habituellement la recapture du neuromédiateur mais peut aussi, selon le gradient de dopamine ou sous l'effet de l'amphétamine (Figure 14), fonctionner en sens inverse et provoquer sa sortie vers le compartiment extracellulaire (*pour revue* : Leviel, 2001). Enfin, une libération dendritique de dopamine dépendante du Ca^{2+} , dont le rôle d'auto-régulation présynaptique

apparaît particulièrement important, a également été mise en évidence dans la SNr (Rosales et coll., 1997).

1.2.2.3 RECAPTURE ET DÉGRADATION

La dopamine libérée dans la fente synaptique peut être inactivée par un mécanisme de recapture impliquant un transporteur spécifique composé de 12 segments transmembranaires. Ce mécanisme de capture, qui dépend des ions Na^+ et Cl^- , est particulièrement efficace car il permet de transporter dans les neurones dopaminergiques plus de 80 % de la dopamine libérée. Cependant, le transporteur de la dopamine n'est pas localisé au niveau de la synapse elle-même mais au niveau de zones pérисynaptiques, ce qui permet à la dopamine de diffuser hors de la synapse. En outre, la dopamine peut également être captée par les cellules gliales et autres populations neuronales environnantes. Enfin, le transporteur de la dopamine constitue une cible pharmacologique privilégiée pour certaines substances addictives telles que la cocaïne et l'amphétamine. De manière similaire, l'amineptine, inhibiteur de recapture de la dopamine, a été utilisée dans le traitement de la dépression, mais est désormais retirée du marché en raison de ses effets addictifs indésirables.

Une fois recaptée par les neurones dopaminergiques, la dopamine peut être recyclée, c'est-à-dire à nouveau stockée dans les vésicules synaptiques, en attente d'une nouvelle dépolarisation, soit catabolisée en acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par la monoamine oxydase de type A (MAO-A) intraneuronale (Figure 14). La dopamine présente dans la fente synaptique peut également être dégradée en 3-méthoxytyramine (3-MT) grâce à l'activité enzymatique de la catéchol-O-méthyl transférase (COMT), une enzyme présente au pôle extracellulaire des membranes des neurones postsynaptiques (Figure 14), ou encore être recaptée par les cellules gliales pour y être transformée en DOPAC par la MAO de type B (MAO-B) localisée dans ces cellules gliales. Chez le Rat, la dopamine est principalement

désaminée par la MAO-A alors que les effets de la MAO-B prédominent chez l'Homme et les primates (Glover et coll., 1977) où elle est notamment responsable de la toxicité du MPTP qu'elle transforme en MPP⁺ (*cf.* partie suivante). Près de 80 % de la dopamine cérébrale est métabolisée en DOPAC (Westerink & Spaan, 1982). Une quantité substantielle de DOPAC étant dérivée, chez le Rat, du stock de dopamine cytosolique (Zetterstrom et coll., 1988), le DOPAC pourrait donc constituer un index relativement fiable de la synthèse de dopamine dans cette espèce. Le DOPAC, libéré dans l'espace extracellulaire, et la 3-MT sont, à leur tour, transformés en acide homovanillique (HVA) par les enzymes COMT et MAO, respectivement. Les stocks d'HVA étant eux-mêmes dérivés essentiellement du métabolisme du DOPAC (Westerink & Spaan, 1982), les variations de contenus tissulaires et extracellulaires en HVA en sont donc le reflet (Imperato & Di Chiara, 1984 ; Zetterstrom & Ungersted, 1984). Les inhibiteurs des MAO (IMAO), sélectifs ou non, ont été à l'origine de diverses applications thérapeutiques parmi lesquelles plusieurs anti-dépresseurs. Les inhibiteurs non sélectifs et irréversibles, comme l'iproniazide (Marsilid[®]) ou la nialamide (Niamide[®]), ont des effets comparables à ceux des antidépresseurs tricycliques de référence. Les IMAO-A, sélectifs des MAO-A qu'ils inhibent de manière réversible, sont représentés par la moclobémide (Moclamine[®]) ou la toloxatone (Humoryl[®]). Néanmoins, en raison notamment de leurs nombreux effets secondaires périphériques (*cf.* partie suivante), les antidépresseurs de type IMAO ne sont plus prescrits ou sinon en dernière intention. Parmi les IMAO-B, la sélégiline (Déprényl[®]) est un inhibiteur irréversible utilisé dans le traitement de la maladie de Parkinson.

1.2.2.4 RÉCEPTEURS ET MÉCANISMES DE TRANSDUCTION

Une fois libérée dans la fente synaptique, la dopamine peut exercer son action au niveau de récepteurs spécifiques : les récepteurs dopaminergiques. La diversité de ces récepteurs, initialement révélée grâce à des approches pharmacologiques, a été par la suite confirmée par les techniques de clonage. La classification de Keibian & Calne (1979) distingue deux groupes distincts (*pour revue* : Costentin, 1991) :

- les récepteurs D₁ (ou « D₁-like ») qui regroupent les récepteurs D₁ proprement dits et les récepteurs D₅ ;
- les récepteurs D₂ (ou « D₂-like ») constitués des récepteurs D₂ proprement dits et des récepteurs D₃ et D₄.

Ces récepteurs appartiennent tous à la super-famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires et sont couplés à des protéines G de nature excitatrice ou inhibitrice. Les récepteurs "D₁-like" sont ainsi couplés positivement à l'adénylyl cyclase (Billard et coll., 1984 ; Hess et coll., 1986). Les récepteurs "D₂-like" sont, en revanche, couplés négativement à l'adénylyl cyclase ou en sont indépendants (*pour revues* : Clark & White, 1987 ; Costentin, 1991). Il a ainsi été proposé que les récepteurs D₂ pourraient exercer une action inhibitrice sur des canaux potassiques, sur la mobilisation du calcium ou encore sur le taux de renouvellement des phospho-inositides (Vallar & Maldolesi, 1989). Les récepteurs D₁, majoritairement post-synaptiques, sont exprimés de manière prédominante au niveau des structures corticales antérieures et du striatum, mais ils sont aussi présents, et selon un niveau d'expression décroissant, dans l'amygdale, le thalamus, le mésencéphale ou l'hypothalamus. Dans le cerveau adulte, la distribution des récepteurs D₁ prédomine largement sur celle de tous les autres types de récepteurs dopaminergiques. Fonctionnellement, les récepteurs D₁ striataux sont impliqués dans le contrôle de l'activité motrice, tandis que ceux exprimés au niveau du cortex participent aux phénomènes mnésiques associés à la mémoire dite « de

travail », ou mémoire à court terme (*pour revue* : Barch, 2004). Les récepteurs D₂, localisés de manière pré- et post-synaptique, sont fortement représentés au niveau striatal où, à l'instar des récepteurs D₁, ils apparaissent fortement impliqués dans la motricité. Les études d'hybridation *in situ* ont, en outre, indiqué que, dans le striatum, les récepteurs D₁ sont préférentiellement exprimés par les neurones contenant la substance P et la dynorphine dont les projections innervent directement le complexe substance noire/noyau entopédonculaire alors que les récepteurs D₂ sont principalement localisés au niveau des neurones co-exprimant les enképhalines, constitutifs de la voie indirecte (*pour revue* : Gerfen, 2000). Comme nous l'avons mentionné précédemment, la validité de ce modèle semble remise en cause par des études indiquant une relative co-localisation des récepteurs D₁ et D₂ au niveau des neurones striataux efférents (Aizman et coll., 2000). La situation est, en outre, devenue plus complexe lorsque l'expression d'ARNm codant les récepteurs D₃, D₄ et D₅ a été mise en évidence au niveau de ces mêmes neurones (*pour revue* : Surmeier et coll., 2007). De plus, il semble que des interactions entre les récepteurs D₁ et D₂ soient possibles, comme en témoigne, chez le patient parkinsonien, l'efficacité synergique des agonistes dopaminergiques associant une activité D₁ et D₂ (Andersen & Gazzara, 1993 ; Bonuccelli et coll., 2002). Les récepteurs D₃ sont préférentiellement localisés dans les structures associées au système limbique, mais de manière non exclusive. Bien qu'absents du striatum dans les conditions normales, il a par ailleurs été mis en évidence que les récepteurs D₃ pourraient y être exprimés de manière phasique chez le rat hémi-parkinsonien traité par la L-DOPA (Bordet et coll., 1997). Les récepteurs D₄ sont principalement exprimés au niveau de la rétine, du cortex cérébral, de l'amygdale, de l'hypothalamus, de l'hypophyse ainsi que dans les ganglions de la base mais de manière très éparse. Fonctionnellement, le rôle des récepteurs D₃ et D₄ reste relativement méconnu en raison du manque d'outils pharmacologiques permettant de les étudier de manière sélective. Néanmoins, on considère que les états de confusion et les hallucinations

observés au cours de certains traitements anti-parkinsoniens pourraient résulter de la stimulation de ces récepteurs. D'une manière générale, une hyperactivité des transmissions dopaminergiques peut conduire à des troubles tels que des accès maniaques, des bouffées délirantes, une hyperkinésie, des dystonies ou encore des mouvements dyskinétiques. Les propriétés pharmacologiques des agonistes ou antagonistes spécifiques des récepteurs dopaminergiques (Table 3) ont ainsi été utilisées dans le traitement de diverses pathologies. Les agonistes dopaminergiques seront décrits plus en détail dans le prochain chapitre et, plus particulièrement, leurs effets moteurs anti-parkinsoniens. Il convient, néanmoins, de mentionner ici l'apomorphine (agoniste non sélectif des cinq types de récepteurs

	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
<u>Agonistes</u>					
<i>Bromocriptine</i>	440*	440*	8*	5*	290*
<i>Quinpirole</i>	1900	-	5	24*	30*
<i>7-OH-DPAT</i>	5 000*	-	10*	1*	650
<i>SKF 38393</i>	1	0,5*	150*	5 000*	1 000*
<i>Apomorphine</i>	0,7	-	0,7*	32*	4*
<u>Antagonistes</u>					
<i>Chlorpromazine</i>	90*	130*	3	4	35
<i>Halopéridol</i>	80*	100*	1	7*	2
<i>Clozapine</i>	170*	330*	230*	170*	21
<i>Raclopride</i>	18 000		1,8	3,5	2 400
<i>Spipérone</i>	350*	3 500*	0,06	0,6	0,08
<i>S-sulpiride</i>	45 000	77 000	15	13*	1 000
<i>YM 43611</i>	10 000+	10 000+	43	11	2
<i>SCH 23390</i>	0,2*	0,3	11 000*	800*	3 000*

Table 3 : Principaux agonistes et antagonistes des récepteurs dopaminergiques.

Les constantes de dissociation (K_i) des principaux agonistes et antagonistes dopaminergiques sont présentées vis-à-vis de chacun des différents types de récepteurs dopaminergiques. Les valeurs suivies d'un astérisque sont considérées comme approximatives (d'après « *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function* », Webster R A, John Wiley & Sons Ltd, 2001).

dopaminergiques), qui est largement utilisée comme outil expérimental et parfois employée en clinique dans le traitement des troubles de l'érection (Apokiron[®]). Les antagonistes dopaminergiques sont principalement utilisés pour leurs propriétés antipsychotiques. Les « antipsychotiques de première génération », encore appelés neuroleptiques en raison des syndromes extrapyramidaux de type parkinsonien associés à leur utilisation, sont en effet caractérisés par une relation de proportionnalité entre leur efficacité thérapeutique et leur capacité à bloquer le récepteur dopaminergique D₂. La découverte de la chlorpromazine (Largactil[®]) au début des années 1950 a ainsi révolutionné le traitement de la schizophrénie et l'halopéridol (Haldol[®]) est encore considéré comme l'un des traitements de référence dans cette pathologie. Néanmoins, ces composés induisent de nombreux effets secondaires, liés notamment à l'hypoactivité dopaminergique qu'ils engendrent (rigidité musculaire, tremblements, mouvements anormaux, etc.), et sont désormais souvent remplacés par des « antipsychotiques de seconde génération » au spectre pharmacologique plus large.

1.2.3 LES ENKÉPHALINES

Les propriétés narcotiques et analgésiques des préparations dérivées du pavot à opium, *Papaver somniferum*, sont connues depuis plusieurs millénaires. La première forme cristalline de son principe actif, la morphine, ne fut cependant isolée qu'en 1803 par Sertürner, un apothicaire allemand. Les propriétés pharmacologiques de cet alcaloïde furent ensuite largement étudiées. Néanmoins, l'existence de récepteurs cérébraux spécifiques ne fut démontrée qu'au début des années 1970 par la mise en évidence de sites de liaison à forte affinité pour les substances opioïdes (Pert & Snyder, 1973 ; Simon et coll., 1973 ; Terenius et coll., 1973), faisant par là-même émerger l'idée d'un système opioïde endogène. Cette notion fut confirmée quelques années plus tard avec la découverte de deux peptides opioïdes endogènes (Hughes et coll., 1975) : la Méthionine-enképhaline (Met-enképhaline) et la

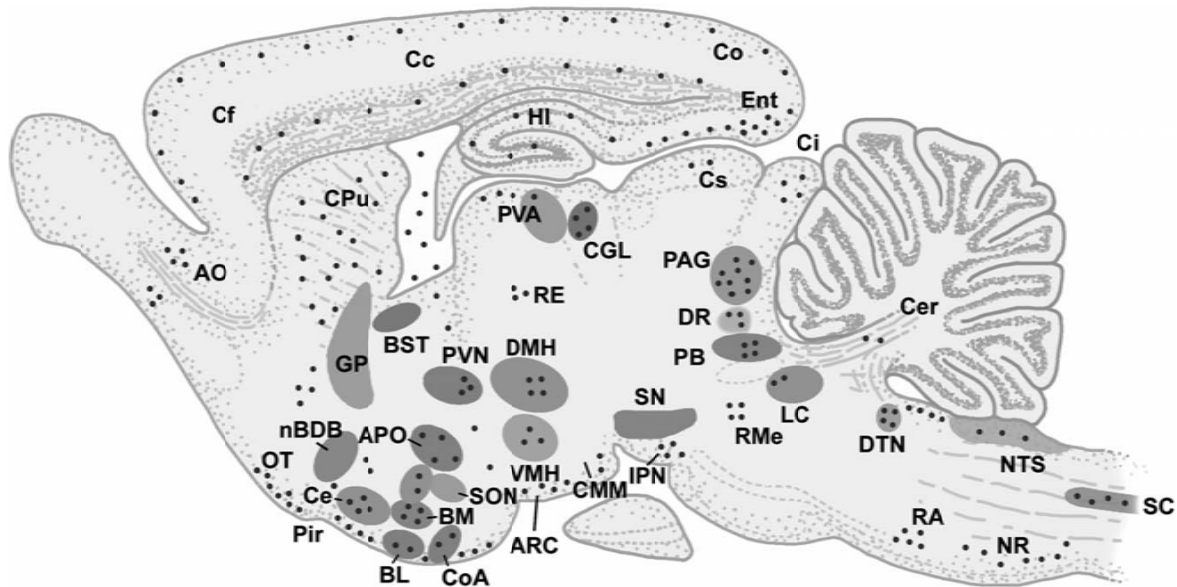


Figure 15 : Représentation schématique de la distribution cérébrale des neurones enképhalinerigiques chez le Rat.

La distribution des neurones exprimant la proenképhaline est représentée de manière schématique.

Abréviations : AO, noyau olfactif antérieur ; APO, aire préoptique ; ARC, noyau arqué ; BL, noyau basolatéral de l'amygdale ; BM, noyau basomédian de l'amygdale ; BST, noyau du lit de la stria terminalis ; Cc, cortex cingulaire ; Ce, noyau central de l'amygdale ; Cf, cortex frontal ; CGL, corps géniculé latéral ; Ci, colliculus inférieur ; CMM, complexe mamillaire médian ; Co, cortex occipital ; CoA, noyau cortical de l'amygdale ; Cs, colliculus supérieur ; CPu, caudéputamen ; DMH, noyau dorsomédian de l'hypothalamus ; DTN, noyau tegmental dorsal ; DR, noyau du raphé dorsal ; Ent, cortex entorhinal ; HI, hippocampe ; IPN, noyau interpédonculaire ; LC, locus cœruleus ; nBDB, noyau de la bande diagonale de Broca ; NR, noyau réticulé ; NTS, noyau du tractus solitaire ; OT, tubercule olfactif ; PAG, substance grise périaqueducale ; PB, noyau parabrachial ; Pir, cortex piriform ; PVA, noyau périventriculaire du thalamus ; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; RA, noyau raphé ; RE, noyau reuniens ; RMe ; noyau du raphé médian ; SC, moelle épinière (corne dorsale) ; SON, noyau supraoptique ; VMH, noyau ventromédian de l'hypothalamus (d'après « *Neurotransmitters and Neuromodulator* » 2nd Ed, von Bohlen und Halbach & Dermietzel, Wiley-VCH, 2006).

Leucine-enképhaline (Leu-enképhaline). Les études anatomiques ont révélé une distribution hétérogène des enképhalines dans le système nerveux central. Elles sont présentes dans le cortex et dans de nombreuses structures incluant, par exemple, le striatum, la substance noire, le globus pallidus, l'hippocampe, l'amygdale ou l'hypothalamus (Figure 15). Les axones et terminaisons contenant les enképhalines ont été identifiés dans les mêmes régions que les corps cellulaires, indiquant que les neurones enképhalinerigiques appartiennent à la catégorie des neurones à projections axonales courtes. Deux exceptions existent cependant :

-
- la première concerne le complexe striato-pallidal au niveau duquel ont été mises en évidence de longues projections enképhalinerigiques originaires du striatum et innervant la partie externe du globus pallidus (voie indirecte) ;
 - la seconde implique les noyaux supra-optique et para-ventriculaire de l'hypothalamus d'où les terminaisons de neurones enképhalinerigiques se projettent vers l'hypophyse.

En ce qui concerne plus particulièrement le striatum, il a été mis en évidence par immunohistochimie que les enképhalines y sont principalement exprimées par des collatérales des projections des neurones épineux striato-pallidaux (Pickel et coll., 1980).

1.2.3.1 BIOSYNTHÈSE ET DÉGRADATION

Comme la plupart des neuropeptides, les enképhalines sont produites par clivage d'un précurseur de haut poids moléculaire : la pro-enképhaline. La pro-enképhaline est également connue sous le nom de pro-enképhaline A. Bien qu'elle contienne une copie de la Leu-enképhaline, la pro-enképhaline B (ou prodynorphine) ne représente pas un précurseur direct des enképhalines mais des dynorphines. Initialement découverte en 1980 par Lewis et collaborateurs au niveau de la glande surrénale, la pro-enképhaline est codée par un gène composé de quatre exons séparés par trois introns. Les quatre exons donnent naissance à un ARNm de 1,2 kb dont le produit initial subit de nombreuses modifications post-transcriptionnelles incluant un clivage enzymatique. Le produit final, la pro-enképhaline, est une protéine d'un poids moléculaire de 31 kDa dont la séquence est décrite dans la Figure 16A. Ce précurseur contient quatre copies de la Met-enképhaline, une copie de la Leu-enképhaline, une copie d'un heptapeptide (Met-enképhalin-Arg⁶-Phe⁷) ainsi qu'un octapeptide (Met-enképhalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸) situé dans la partie terminale. Les séquences individuelles de ces peptides sont séparées par des peptides dibasiques contenant des sites de

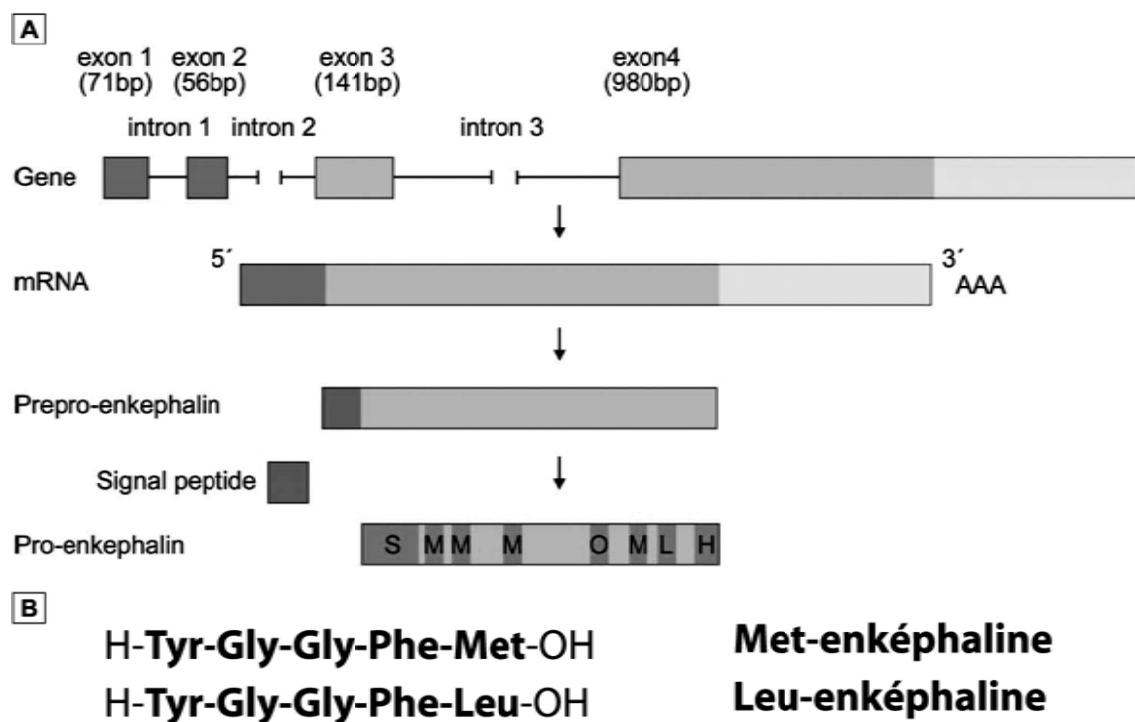


Figure 16 : Biosynthèse et structure des enképhalines.

(A) Maturation de la pro-enképhaline. *Abréviations* : bp, paire de bases ; H, heptapeptide (Met-ENK-Arg-Phe) ; L, Leu-enképhaline ; M, Met-enképhaline ; O, octapeptide (Met-ENK-Arg-Gly-Leu) ; S, synenképhaline (d'après « *Neurotransmitters and Neuromodulator* » 2nd Ed, von Bohnen und Halbach & Dermietzel, Wiley-VCH, 2006). (B) Structure des enképhalines.

reconnaissance pour les clivages protéolytiques que subit la pro-enképhaline au niveau du réticulum endoplasmique. Concernant la structure des enképhalines (Figure 16B), il semble que la Tyr¹ ne puisse être remplacée par un autre acide aminé sans qu'apparaisse une réorientation stéréochimique provoquant une importante perte d'activité (Simantov & Snyder, 1976).

Une fois synthétisées, les enképhalines peuvent être libérées dans la fente synaptique selon un mécanisme Ca²⁺-dépendant (Lindberg & Dahl, 1981). Il n'existe pas de système de recapture des enképhalines libérées dans le compartiment extracellulaire. Néanmoins, les études *in vitro* et *in vivo* ont déterminé que les enképhalines présentent un taux de renouvellement très rapide, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes (Hughes et coll., 1975 ; Simantov & Snyder, 1976), suggérant une inactivation très rapide. Le processus catabolique met en jeu

l'action concomitante de deux métallopeptidases dépendantes des ions Zn^{2+} et liées à la membrane plasmique (*pour revue* : Roques et coll., 1993) : l'endopeptidase neutre (encore appelée néprilysine ou NEP ; EC3.4.24.11) et l'aminopeptidase N (APN, EC3.4.11.2). L'APN, clivant la liaison Tyr¹-Gly², semble principalement responsable de l'action très brève exercée par les enképhalines. Comme la NEP, il s'agit d'une glycoprotéine (~ 140 kDa) faisant intégralement partie de la membrane plasmique (ectopeptidase). Son existence a été révélée au début des années 1980 grâce la bestatine, inhibiteur non spécifique des aminopeptidases, qui provoque des effets analgésiques bloqués par la naloxone. À partir de coupes cérébrales, il a, par la suite, été mis en évidence que ces effets résultent d'une protection des enképhalines endogènes. L'APN est une enzyme non spécifique dont la distribution périphérique est relativement ubiquiste. Au niveau central, elle semble principalement localisée au niveau des membranes synaptiques (Matsas et coll., 1985). L'existence de la NEP, initialement appelée « enképhalinase », a été révélée en 1978 par l'équipe du Pr. Jean-Charles Schwartz (Malfroy et coll., 1978). Bien que quelques formes solubles aient été décrites chez l'Homme, la NEP est une glycoprotéine de 90 à 100 kDa associée à la membrane plasmique (ectopeptidase). Elle est constituée d'un unique domaine transmembranaire et d'une large partie C-terminale contenant le site catalytique de l'enzyme et le motif *HEXXH*, site de liaison caractéristique des ions Zn^{2+} (*pour revue* : Turner & Tanzawa, 1997). Cette enzyme, dont l'affinité pour les enképhalines est de l'ordre du nM, induit un clivage au niveau des acides aminés Gly³-Phe⁴, générant un tripeptide Tyr¹-Gly²-Gly³. L'activité catalytique n'est cependant pas spécifique des enképhalines puisque cette enzyme peut cliver de nombreux petits peptides (moins de 30 résidus) tels que la neurotensine, la substance P, les tachykinines ou les peptides natriurétiques. Chez les mammifères, la NEP est assez largement distribuée. Le thiorphan est le plus puissant et le chef de file des inhibiteurs de la NEP avec un K_i de l'ordre de quelques nM (Roques et coll.,

1980). Ce composé franchit néanmoins relativement mal la barrière hémato-encéphalique, ce qui limite grandement son utilisation au niveau cérébral. Le racécadotril (Tiorfan[®]), ester benzylique du thiorphan, possède une affinité bien moindre (de l'ordre du μM *in vitro*) mais il est hydrolysé *in vivo* en thiorphan au contact des membranes cérébrales, constituant ainsi un précurseur du thiorphan, administrable par voie systémique. Le kélatorphan, enfin, est un inhibiteur mixte de la NEP (K_i de l'ordre du nM) et de l'APN (K_i de l'ordre du μM) mais, à l'instar du thiorphan, il présente l'inconvénient de ne pas franchir pas la barrière hémato-méningée (pour revue : Roques et coll., 1990).

1.2.3.2 RÉCEPTEURS ET MÉCANISMES DE TRANSDUCTION

Selon la classification actuelle (pour revue : Waldhoer et coll., 2004), les récepteurs opioïdes endogènes sont répartis en quatre catégories :

- les **récepteurs μ** (mu pour morphine) ou **MOP-R** (en anglais « *mu-opioid receptor* ») ;
- les **récepteurs δ** (delta par référence aux canaux déférents de Souris où ils ont été découverts) ou **DOP-R** (en anglais « *δ -opioid receptor* ») ;
- les **récepteurs κ** (kappa par référence à la kétocyclazocine, agoniste sélectif) ou **KOP-R** (en anglais « *δ -opioid receptor* ») ;
- les **récepteurs NOP** initialement appelés LC32, ORL-1 ou récepteur nociceptin/orphanin FQ.

Ces récepteurs ont tous été clonés et font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Il y a, cependant, une disparité évidente entre l'existence d'uniquement quatre gènes codant les récepteurs opioïdes et les données indiquant une multitude de profils pharmacologiques différents (pour revue : Bodnar & Klein, 2005). Ces phénotypes

pharmacologiques variés ont incité de nombreux auteurs à suggérer que les protéines codant les récepteurs opioïdes pourraient subir des modifications post-transcriptionnelles (Pasternak, 2001), des processus d'épissage alternatifs, être soumis à une agglomération avec des protéines additionnelles et/ou être impliqués dans la formation de complexes homo- ou hétérodimériques (Jordan & Devi, 1999). Les récepteurs κ et les récepteurs de la nociceptine n'étant pas impliqués dans les effets centraux des enképhalines ne seront, par conséquent, pas abordés.

Les récepteurs δ

Les récepteurs opioïdes de type δ ont été initialement proposés comme les récepteurs préférentiels des enképhalines endogènes (Hughes et coll., 1975). Ces récepteurs opioïdes ont été identifiés *in vitro* en comparant les effets de la morphine et d'analogues peptidiques des enképhalines sur les contractions, électriquement induites, de l'iléon de Cobaye (exprimant principalement des récepteurs de type μ) à ceux obtenus au niveau des canaux déférents de Souris. La plus grande efficacité de la morphine dans le premier cas et des enképhalines dans le second permis de suggérer l'existence de différentes populations de récepteurs opioïdes (Hughes et coll., 1975). Les études pharmacologiques reposant sur l'expression différente des récepteurs μ et δ dans ces deux systèmes biologiques ont, par la suite, confirmé la notion d'une sélectivité des enképhalines pour les récepteurs opioïdes de type δ . Ainsi, il a été mis en évidence que la sélectivité de la Leu- et de la Met-enképhaline à l'égard des récepteurs δ est respectivement de 30 et 15 fois supérieure à celle des récepteurs μ (Wuster & Herz, 1978 ; Kramer et coll. 1993). Les travaux de Raynor et collaborateurs (1994), effectués sur des systèmes cellulaires exprimant les ADNc codant les différents types de récepteurs opioïdes, ont en partie mis en défaut ce concept en indiquant que l'affinité de ces deux peptides pour les

	μ	δ	κ
Leu-enképhaline	6,19 ± 1,00	0,37 ± 0,04	93,65 ± 13,39
Met-enképhaline	1,80 ± 0,15	0,45 ± 0,03	47,44 ± 11,99
Naloxone	0,92 ± 0,21	18,76 ± 0,68	2,09 ± 0,39
Morphine	7,48 ± 0,59	302,15 ± 20,57	52,65 ± 4,24

Table 4 : Sélectivité de diverses substances opioïdes à l'égard des récepteurs opioïdes de type μ , δ et κ .

Les constantes de dissociation (K_i) sont exprimées en nM (d'après *Mansour et coll., 1995*).

récepteurs μ et δ pourrait être identique. Dans des conditions similaires, Mansour et collaborateurs (1995) ont néanmoins apporté la preuve d'une sélectivité favorable aux récepteurs δ (Table 4) qui, bien que non exclusive, est désormais communément admise (*pour revue : Quock et coll., 1999*).

Les techniques autoradiographiques ont révélé l'existence d'une distribution hétérogène des récepteurs δ . Comme indiqué dans la Table 5, les niveaux d'expression les plus élevés sont rencontrés dans le noyau accumbens et le tubercule olfactif. Le striatum, l'amygdale et certaines aires corticales contiennent également de nombreux récepteurs δ , mais en relativement moindre quantité. Des données pharmacologiques ont suggéré l'existence de deux sous-populations distinctes de récepteurs δ (*pour revue : Quock et coll., 1999*) :

- les récepteurs δ_1 qui pourraient être principalement stimulés par la [D-Pen²,D-Pen⁵]-enképhaline (DPDPE) et inhibés par la [Ala²,Leu⁵,Cys⁶]-enképhaline ;
- les récepteurs δ_2 qui seraient stimulés par la [D-Ser²,Leu⁵,Thr⁶]-enképhaline (DSLET) et la [D-Ala²]-deltorphine II (Del-II) et inhibés par le naltrindole-5'-isothiocyanate.

Cependant, aucun de ces sous-types de récepteurs n'a été cloné et il n'y a donc, à ce jour, aucun support moléculaire à l'existence de récepteurs δ_1 et δ_2 distincts. La mise en évidence,

<u>Densité supérieure à 0,5 fmol/mm²</u>	<u>Densité inférieure à 0,1 fmol/mm²</u>
Couche plexiforme externe du bulbe olfactif	Couche pyramidale de l'hippocampe
Noyau accumbens	Colliculus inférieur
Tubercule olfactif	Noyau central de l'amygdale
	Habenula
	Globus pallidus
	Hypothalamus
	Noyau glomérulaire du bulbe olfactif
	Substance gélatineuse de la moelle épinière
	Stria terminalis
	Colliculus supérieur
	Substance noire
	Thalamus
	Corps géniculés latéraux
	Substance grise ventrale de la moelle épinière

Table 5 : Distribution des récepteurs opioïdes de type δ dans le cerveau de Rat.

Les niveaux d'expression des récepteurs opioïdes δ sont répartis en 3 catégories : élevé, moyen et faible (d'après Quock et coll., 1999).

sur des synaptosomes préparés à partir de la moelle épinière, que la DPDPE stimule la libération d'adénosine induite par la morphine, sans développer elle-même d'effet intrinsèque sur cette libération (Cahill et coll., 1996), a néanmoins fait émerger l'idée que les profils pharmacologiques des récepteurs δ_1 et δ_2 pourraient, en fait, refléter l'existence d'hétérodimères μ/δ fonctionnels. La dimérisation est un mécanisme de régulation modulant les processus de signalisation de plusieurs classes de récepteurs membranaires. En ce qui concerne les récepteurs opioïdes de type δ , il a ainsi été mis en évidence que des processus d'hétérodimérisation impliquant les récepteurs opioïdes de type μ et κ ou encore les récepteurs β_2 -adrénergiques peuvent altérer les propriétés de fixation des différents ligands (Jordan & Devi, 1999 ; George et coll., 2000) et affecter l'adressage des récepteurs tant *in vitro* (Jordan et coll., 2001) qu'*in vivo* (He et coll., 2002). Par ailleurs, il semblerait que

l'hétérodimérisation μ/δ puisse avoir une signification fonctionnelle dans le contexte de l'analgésie (Gomes et coll., 2004).

En ce qui concerne les mécanismes de signalisation intracellulaire, il est communément admis que les récepteurs δ sont négativement couplés à l'adénylyl cyclase (*pour revue* : Quock et coll., 1999). Il a, en outre, été mis en évidence à partir de différentes lignées cellulaires que des ligands sélectifs des récepteurs opioïdes de type δ sont également capables d'exercer un effet stimulant sur certaines autres voies de transduction. Une activation de la protéine kinase C (PKC) (Lou & Pei, 1997), un accroissement de l'activité des MAP-kinases (Burt et coll., 1996 ; Fukuda et coll., 1996) ou une augmentation des taux intracellulaires de calcium à partir des stocks intracellulaires (Tang et coll., 1995) ou du compartiment extracellulaire (Allouche et coll., 1996 ; Smart & Lambert, 1996) ont, en effet, été démontrés. Une stimulation de l'activité adénylyl cyclase a par ailleurs également été observée au niveau des tubercules olfactifs (Olianas et Onali, 1995). D'un point de vue fonctionnel, les récepteurs δ sont principalement impliqués dans l'analgésie. Au niveau supraspinal, leurs effets analgésiques semblent couplés à l'activation des récepteurs de type μ alors qu'ils apparaissent en être indépendants au niveau spinal. De nombreux autres effets ont en outre été également décrits, tels qu'une implication dans certains processus mnésiques (*pour revue* : Martinez et coll., 1988), qu'une modulation de l'activité motrice (Calenco-Choukroun et coll., 1991 ; Longoni et coll., 1991 ; Meyer et coll., 1995 ; Negri et coll., 1996), ainsi que dans les phénomènes d'anxiété et de dépression (*pour revue* : Jutkiewicz, 2006). Les principaux agonistes et antagonistes des récepteurs δ sont représentés dans la Figure 17.

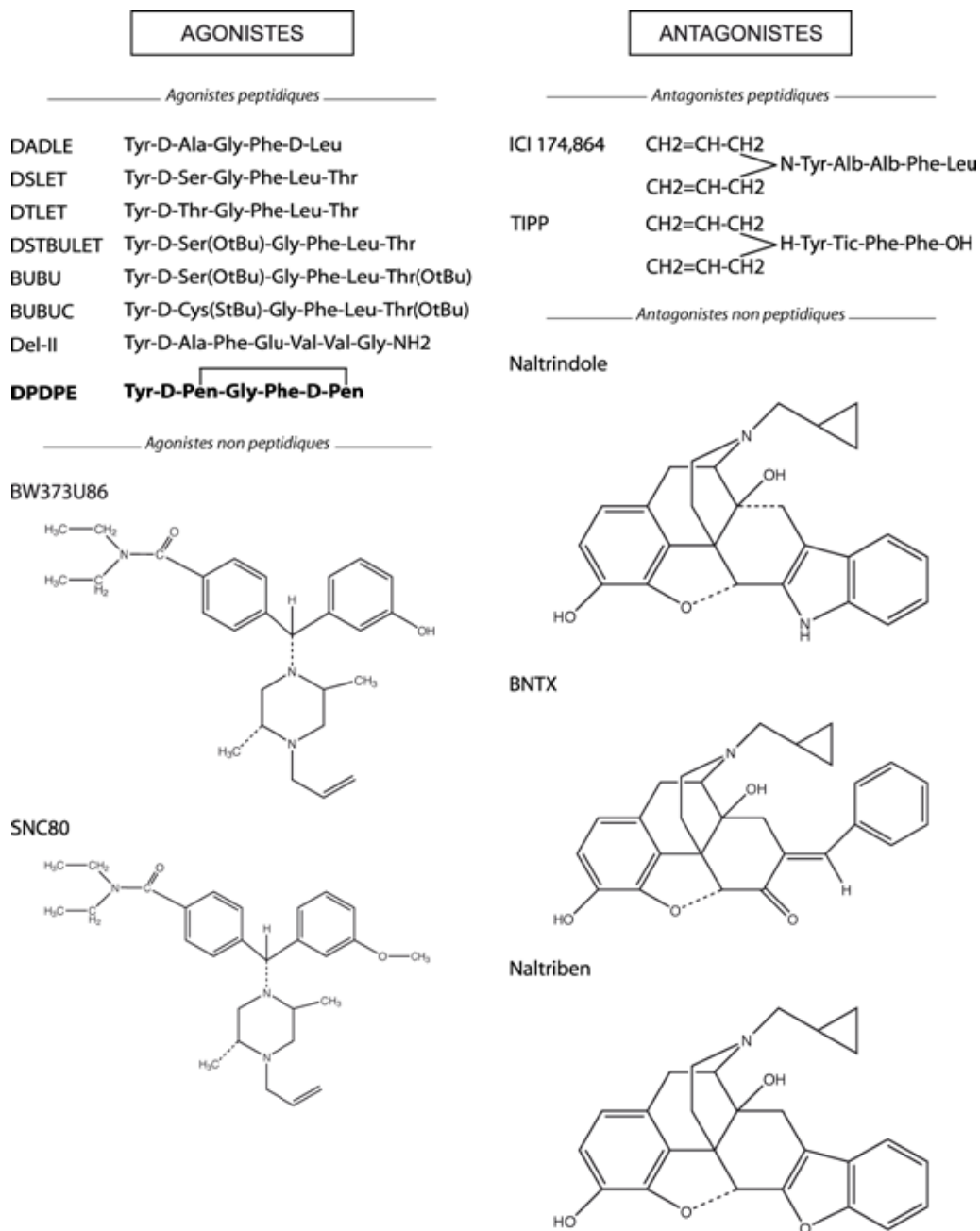


Figure 17 : Principaux agonistes et antagonistes des récepteurs opioïdes de type δ .

Structures des principaux agonistes et antagonistes, peptidiques et non peptidiques, des récepteurs opioïdes de type δ . *Abréviations* : BNTX, 7-benzylidène naltrexone ; BUBU, [D-Ser² (O-tert-butyl), Leu⁵, Thr⁶ (O-tert-butyl)]-enképhaline ; BUBUC, [D-Cys(StBu)², Leu⁵]-enképhaline-Thr(OtBu) ; BW373U86, (\pm)-4-[(αR)- α -((2S,5R)-4-allyl-2,5-diméthyl-1-pipérazinyl)-3-hydroxybenzyl]-N,N-diéthylbenzamide ; DeL-II, deltorphine II ; DADLE, [D-Ala²-Leu⁵]-enképhaline ; DPDPE, [D-Pen², D-Pen⁵]-enképhaline ; DSLET, [D-Ser², Leu⁵, Thr⁶]-enképhaline ; DTLET, [D-Thr², Leu⁵, Thr⁶]-enképhaline ; DSTBULET, [D-Ser²(O-tert-butyl), Leu⁵]-enképhaline-Thr⁶ ; ICI174,864, N,N-diallyl-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu-OH ; Naltrindole, 17-cyclopropylméthyl-6,7-dehydro-4,5-époxy-3,14-dihydroxy-6,7,2',3'-indolmorphinan hydrochloride ; Naltriben, naltrindole buzofurane ; SNC80, (+)-4-[(αR)- α -((2S,5R)-4-allyl-2,5-diméthyl-1-pipérazinyl)-3-méthoxybenzyl]-N,N-diéthylbenzamide ; TIPP, Tyr-Tic-Phe-Phe-OH (d'après *Dhawan et coll., 1996*).

Les récepteurs μ

Bien que de manière non préférentielle, les enképhalines sont également susceptibles de se fixer *in vivo* aux récepteurs de type μ . De plus, l'hypothèse d'une hétérodimérisation entre les récepteurs μ et δ est souvent évoquée. Il semble néanmoins que les profils pharmacologiques des systèmes hétérologues impliquant les récepteurs δ correspondent principalement à ceux des récepteurs δ_1 (Waldhoer et coll., 2004) et nous avons consacré notre travail à l'étude des effets de la DPDPE, elle-même considérée comme caractéristique des hypothétiques récepteurs δ_1 . Par conséquent, les récepteurs de type μ ne seront décrits que très brièvement. Les récepteurs opioïdes de type μ manifestent une haute affinité pour la morphine et sont principalement impliqués dans les phénomènes de soulagement de la douleur. Ils induisent par ailleurs une dépression respiratoire et inhibent la mobilité du tractus gastro-intestinal. Il existe deux variants d'épissage (μ_1 et μ_2) qui diffèrent dans leurs modalités d'internalisation et leurs profils pharmacologiques. Les récepteurs μ sont largement représentés dans le néocortex, le striatum, le noyau accumbens, l'hippocampe ou encore l'amygdale. En ce qui concerne les processus de signalisation cellulaire, les récepteurs μ apparaissent, comme les autres récepteurs opioïdes, négativement couplés à l'adénylyl cyclase, par l'intermédiaire de laquelle ils inhibent la production d'AMPc. La naloxone est un inhibiteur non sélectif des récepteurs opioïdes qui manifeste néanmoins une meilleure affinité pour les récepteurs de type μ .

1.3 MALADIE DE PARKINSON ET DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA

La maladie de Parkinson a été initialement décrite en 1817 par un médecin anglais, James Parkinson. Cette pathologie constitue, après la maladie d'Alzheimer, l'affection neurodégénérative la plus répandue. Sa prévalence est en effet estimée à 0,3 % de la

population mondiale âgée de 55 à 65 ans, tranche d'âge à laquelle apparaissent généralement les premiers signes de la maladie, et à près de 5 % chez les personnes âgées de plus de 85 ans (de Lau et coll., 2004). En raison du vieillissement démographique, cette prévalence ne va probablement cesser de s'accroître et la maladie de Parkinson pourrait ainsi, dans les années à venir, représenter un véritable problème de santé public. La maladie de Parkinson résulte d'une dégénérescence bilatérale et sélective des neurones de la voie dopaminergique nigro-striatale (Figure 18A). La symptomatologie de cette maladie, caractérisée par des troubles moteurs extrapyramidaux, traduit les dysfonctionnements induits par cette perte neuronale au niveau du système des ganglions de la base, responsable de l'élaboration et du contrôle de la motricité (Figure 18B). Il n'existe actuellement aucun traitement étiologique de la maladie de Parkinson. En effet, la thérapie classique consistant, grâce à la L-DOPA, précurseur immédiat de la synthèse de dopamine, à suppléer la carence en dopamine ne freinent pas le processus de dégénérescence neuronale à l'origine de la maladie. De plus, chez la majorité des patients, cette thérapie fait progressivement apparaître des effets indésirables. Outre les phénomènes de fin de dose « wearing-off » et des phénomènes « on-off », les mouvements involontaires (ou dyskinésies) provoqués par la L-DOPA sont en effet fréquents et particulièrement invalidants. L'apparition de ces effets secondaires relativise alors le bénéfice du traitement anti-parkinsonien. La compréhension des différents mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les dyskinésies induites par la L-DOPA s'avère cruciale pour élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de les prévenir ou, à défaut, de les réduire.

1.3.1 LA MALADIE DE PARKINSON

La maladie de Parkinson constitue l'un des principaux champs d'investigation dans le domaine des neurosciences. À titre d'exemple, une requête avec le seul mot-clé « Parkinson » sur le site internet Pubmed, l'outil de recherche de données bibliographiques dans les

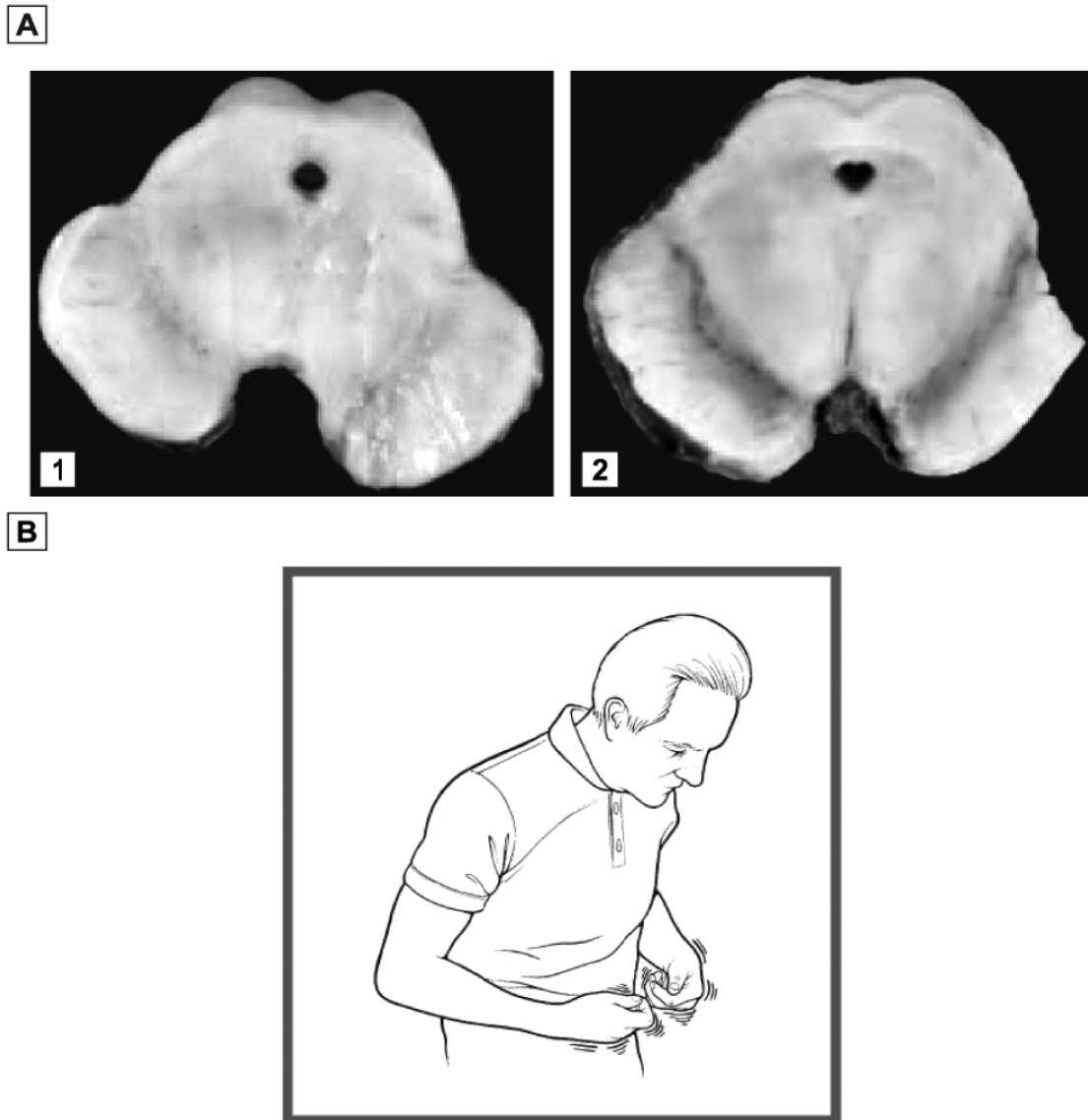


Figure 18 : Principales caractéristiques anatomiques et motrices de la maladie de Parkinson.

(A) Caractéristiques anatomiques de la maladie de Parkinson idiopathique. (1) Coupe coronale de cerveau humain prélevé *post mortem* chez un patient parkinsonien âgé de 66 ans. La décoloration de la substance noire illustre de manière caractéristique la dégénérescence bilatérale des neurones dopaminergiques. (2) Cerveau humain normal (d'après « *Clinical Neuropathology: Text and Color Atlas* », Haberland C, Demos Medical Publishing, New York, 2007). (B) Posture et tremblement de repos caractéristiques de l'état parkinsonien. Le patient peut présenter des difficultés à initier les mouvements (akinésie). Le comportement moteur peut également être altéré au niveau de sa vitesse et de sa spontanéité (bradykinésie) (d'après « *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications* », 3th ed., Haines DE, Churchill Livingstone, 2004).

domaines de la biologie et la médecine, développé par le *National Center for Biotechnology Information* (Maryland, U.S.A.), génère à ce jour quelque 42 500 résultats dont plus de 3 000 rien que pour l'année en cours. Ces études, orientées « tous azimuts », ont fourni une

multitude de données expérimentales. Nous n'évoquons, dans cette partie, que les notions communément admises, ainsi que celles plus particulièrement impliquées dans notre problématique.

1.3.1.1 ASPECTS CLINIQUES ET ANATOMO-PATHOLOGIQUES

a) Symptomatologie

La forme idiopathique de la maladie de Parkinson est principalement caractérisée par quatre symptômes moteurs extrapyramidaux : un tremblement de repos, une rigidité, une bradykinésie (rareté et lenteur dans l'exécution du mouvement) et une instabilité posturale (*pour revue* : Pallone, 2007). Ces symptômes moteurs invalidants, qui apparaissent lorsque plus de 70 % des neurones dopaminergiques de la pars compacta de la substance noire (SNc) ont dégénéré, présentent un développement asymétrique, notamment au début de la maladie, qui résulte de la dégénérescence dissymétrique des neurones dopaminergiques de la SNc (Kempster et coll., 1989). Le tremblement de repos, qui implique principalement la partie distale des membres supérieurs, est généralement considéré par le grand-public comme la principale caractéristique de la maladie de Parkinson. Chez 75 % des patients, c'est en effet la première manifestation motrice de cette pathologie. La rigidité est définie comme une résistance passive aux mouvements. Elle est appréciée par le praticien en exerçant une flexion au niveau des membres du patient dont les muscles, de manière passive et involontaire, présentent alors une résistance qui fluctue par à-coups selon un effet « de roue dentée ». La bradykinésie se caractérise par une difficulté à initier le mouvement et une altération de certains mouvements automatiques comme, par exemple, le balancement des bras au cours de la marche, ou le clignement des paupières. L'instabilité posturale se traduit par une altération

du réflexe de maintien postural. La diminution de la fréquence des pas, de la longueur des enjambées, de l'amplitude des mouvements des membres supérieurs et les altérations du maintien de la posture constituent, conjointement, un important risque de chutes et de blessures. Cependant, les symptômes de la maladie de Parkinson ne sont pas limités à des dysfonctionnements moteurs. En effet, dans les stades les plus avancés de la maladie, on constate que la dégénérescence des neurones dopaminergiques peut s'étendre à d'autres populations neuronales (noradrénergique, sérotoninergique et cholinergique), générant des troubles « non moteurs » résumés dans la Table 6. Les troubles cognitifs présentés par les patients parkinsoniens concernent essentiellement les fonctions visuo-spatiale, exécutive et mnésique (Wolters & Francot, 1998 ; Bodis-Wollner, 2003). Ces troubles cognitifs, qui résultent de dysfonctionnements au niveau des circuits associatifs et limbiques dans lesquels les ganglions de la base sont impliqués, peuvent rester discrets au cours de l'évolution de la maladie ou évoluer vers une démence qui tend à augmenter avec l'âge puisque 65 % des patients parkinsoniens de plus de 85 ans en seraient atteints.

a) Anatomicopathologie

La maladie est diagnostiquée, au cours de la vie des patients, à partir de différents critères cliniques ou d'imagerie, comme la tomographie par émission monophotonique (SPECT) au DaTSCAN[®], qui pourront être confirmés *post mortem*, par évaluation de la perte des neurones dopaminergiques nigro-striataux et observation, dans certains cas, d'inclusions intracellulaires protéiques et éosinophiles appelées corps de Lewy.

Symptômes majeurs :

- Bradykinésie (*mouvements lents, diminution de la fréquence et de l'amplitude des mouvements répétitifs*) ;
- Tremblement de repos (*apparaissant généralement au niveau de la main*) ;
- Rigidité (*résistance passive au mouvement, selon un effet de « roue dentée »*) ;
- Instabilité posturale (*observée dans les stades tardifs de la pathologie*).

Autres symptômes :

- Effet significatif de la L-DOPA ;
 - Symptômes moteurs souvent unilatéraux au début de la pathologie ;
 - Démarche rigide avec ralentissement du balancement des bras ;
 - Difficulté à se redresser à partir d'une position assise ;
 - Odorat altéré ;
 - Atténuation de la voix ;
 - Posture voûtée ;
 - Dépression et/ou anxiété ;
 - Démarche caractérisée par un traînement des pieds et un fléchissement des genoux et du tronc ;
 - Le patient éprouve des difficultés à se retourner dans son lit et à ajuster ses couvertures ;
 - Difficulté à contenir la salive (*écoulements de bave*) ;
 - Constipation ;
 - Micrographie (*trouble de l'écriture caractérisé par une diminution de l'amplitude des caractères*) ;
 - Troubles du sommeil ;
 - Séborrhée (*sécrétion accrue des glandes sébacées*) ;
 - Apparition de troubles cognitifs dans les stades les plus tardifs.
-

Table 6 : Les différents symptômes de la maladie de Parkinson.

Si un seul des symptômes majeurs peut être observé dans les stades les plus précoces de la pathologie, tous s'expriment généralement au long cours. Les autres symptômes apparaissent de manière plus hétérogène. Leur identification est néanmoins importante car certains de ces troubles peuvent nécessiter une thérapie complémentaire (d'après Savitt et coll., 2007).

Perte neuronale

La dégénérescence des neurones dopaminergiques mésencéphaliques est la caractéristique anatomo-pathologique majeure de la maladie de Parkinson. Cette dégénérescence, prédominante dans la SNc où elle peut atteindre jusqu'à 80 % des cellules, est plus particulièrement marquée dans les régions caudale et ventro-latérale de cette structure (Fearnley & Lees, 1991). Les corps cellulaires des neurones nigro-striataux étant particulièrement riches en mélanine (pigment brun foncé/noir), leur raréfaction conduit, par conséquent, à une forte dépigmentation de la SNc (Figure 18A). Au niveau de l'ATV, structure adjacente, la perte neuronale est, en revanche, plus modérée (40 à 50 %) tandis que les neurones dopaminergiques des autres régions mésencéphaliques sont préservés. De manière intéressante, une dégénérescence des neurones de la SNc se produit également au cours du vieillissement normal avec un taux de perte évalué à environ 5 % par décennie. Dans ce cas, c'est cependant la partie dorso-médiane de la SNc qui apparaît principalement affectée (Fearnley & Lees, 1991). Le striatum, où les terminaisons dopaminergiques originaires de la SNc sont particulièrement abondantes, est la structure cérébrale la plus affectée par cette perte neuronale. La déafférentation dopaminergique y est toutefois hétérogène (Kish et coll., 1988) puisque la déplétion en dopamine est plus sévère dans le putamen (jusqu'à - 95 %), avec une atteinte préférentielle des régions postérieure et dorsale, que dans le noyau caudé (- 80 %) où la partie antéro-dorsale est la plus affectée. Le « striatum ventral », constitué du noyau accumbens et des parties les plus ventrales du putamen et du noyau caudé antérieur, est en revanche relativement préservé (Kish et coll., 1988). D'autres régions cérébrales, telles que les aires corticales motrice, cingulaire et orbito-frontale (Scatton et coll., 1983 ; Gaspar et coll., 1991), les segments interne et externe du pallidum ou le NST (Hornykiewicz, 1998), semblent, en outre, être également affectées par cette dénervation dopaminergique, quoiqu'en moindre proportion. Il apparaît, enfin, que la perte neuronale associée à la maladie de

Parkinson n'est pas limitée aux seuls neurones dopaminergiques, puisqu'une dégénérescence, concomitante à l'apparition de corps de Lewy et affectant des neurones noradrénergiques du locus cœruleus, sérotoninergiques des noyaux du raphé et cholinergiques du noyau basal de Meynert, a également été mise en évidence (*pour revue* : Hornykiewicz & Kish, 1987).

Les corps de Lewy

En 1912, Lewy révéla la présence d'inclusions, auxquelles on donna ultérieurement son nom, au niveau du noyau basal magnocellulaire et du noyau moteur dorsal du nerf vague de cerveaux de sujets parkinsoniens. Ces corps de Lewy correspondent, en fait, à des agrégats intra-neuronaux de protéines cytoplasmiques, composés majoritairement d' α -synucléine, de parkine, d'ubiquitine, de protéines chaperonnes et de neurofilaments (Figure 19). Ces inclusions ne sont cependant pas spécifiques de la maladie de Parkinson car elles sont également observées dans le cerveau de sujets âgés, ainsi que dans des cas de démence sénile (Forno, 1969). Néanmoins, leur présence au niveau cérébral permet, conjointement à la dégénérescence neuronale, de confirmer le diagnostic. Des études plus récentes ont, en outre, indiqué que ces inclusions peuvent être également observées *post mortem* au niveau du système nerveux périphérique de patients parkinsoniens, dans les neurones des systèmes entérique et sympathique notamment (Iwanaga et coll., 1999 ; Braak et coll., 2006). Une étude anatomo-pathologique a récemment tenté de déterminer un profil de progression de la pathologie grâce un marquage immuno-histochimique de l' α -synucléine (Braak et coll., 2003). Selon cette étude, les corps de Lewy apparaîtraient initialement dans la moelle épinière, affectant le noyau moteur dorsal du nerf vague, et gagneraient ensuite le noyau caudal du raphé, la formation réticulée, ainsi que le locus cœruleus noradrénergique. Les neurones dopaminergiques de la SNc ne seraient atteints que dans un troisième temps et leur

dégénérescence massive interviendrait plus tardivement, conjointement à l'apparition des corps de Lewy au niveau cortical. La signification biologique de ces données reste cependant quelque peu nébuleuse car on ne connaît pas précisément les mécanismes qui sous-tendent la formation de ces inclusions dans la maladie de Parkinson. Néanmoins, l'accumulation dans

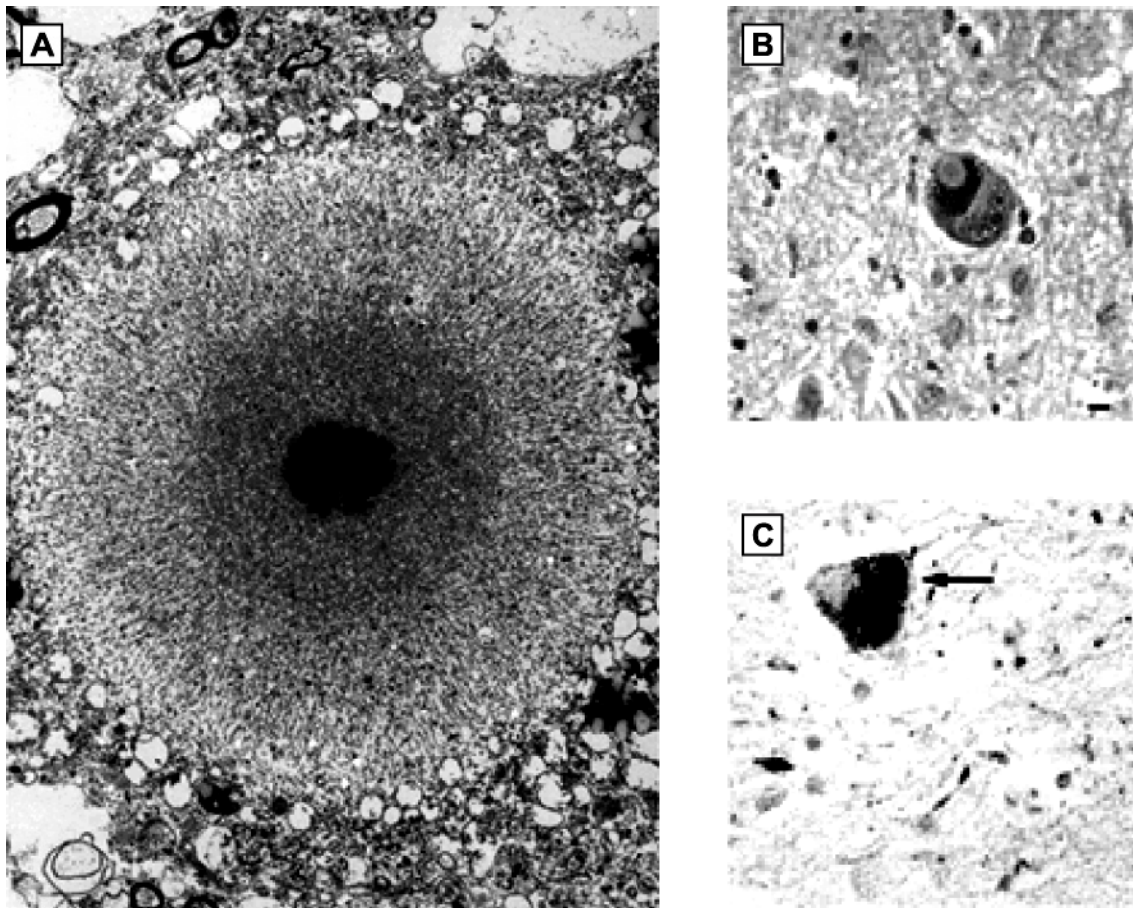


Figure 19 : Les corps de Lewy.

(A) Micrographie électronique montrant la composition d'un corps de Lewy : le coeur dense et granulaire est entouré d'un halo de filaments radiaux. (B) Détection immuno-histochimique de l' α -synucléine. (C) Coloration hématoxyline/éosine convertie en niveaux de gris (d'après Beal, 2001).

ces agrégats de nombreuses formes mutées non fonctionnelles de protéines impliquées dans la machinerie cellulaire suggère que leur formation pourrait être liée au dérèglement du système ubiquitine-protéasome qui contrôle la qualité des protéines cellulaires, en éliminant les protéines endommagées, les protéines présentant une conformation anormale et, de manière plus générale, les protéines inadaptées (*pour revue* : Savitt et coll., 2007). L'ubiquitine est

effectivement un marqueur de dégradation des protéines non fonctionnelles. Elle se lie de façon covalente aux protéines à éliminer grâce à une ubiquitine ligase : la parkine. La production de formes non fonctionnelles de ces deux protéines provoquerait ainsi une défaillance du système de contrôle de qualité des protéines. Cette défaillance pourrait engendrer une agrégation de protéines, dont l' α -synucléine, qui serait toxique pour les neurones. L'hypothèse d'une toxicité intrinsèque des corps de Lewy est cependant contestée par des données suggérant que l' α -synucléine pourrait, au contraire, jouer un rôle protecteur (Manning-Bog et coll., 2003 ; Albani et coll., 2004).

1.3.1.2 ÉTIOLOGIE

L'origine exacte de la dégénérescence des neurones dopaminergiques du mésencéphale observée dans la maladie de Parkinson demeure inconnue, bien que de très nombreuses pistes expérimentales aient été explorées. Parmi les multiples hypothèses qui ont été évoquées au cours de ces recherches, une dégénérescence des neurones dopaminergiques par apoptose a été proposée sur la base d'observations anatomo-pathologiques (Anglade et coll., 1997). Ce processus apoptotique résulterait d'une cascade d'évènements au sein de laquelle le stress oxydatif constituerait un élément majeur (*pour revue* : Savitt et coll., 2007). Le déficit du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, mis en évidence *post mortem* dans la substance noire de patients parkinsoniens, pourrait générer des radicaux libres oxygénés. L'interaction entre ces radicaux libres et les lipides polyinsaturés entraîne une peroxydation excessive des lipides qui conduirait, à terme, à la mort neuronale. Cependant, les théories actuelles mettent plutôt l'accent sur des facteurs génétiques et environnementaux (*pour revue* : Khandhar & Marks, 2007).

Allèle/Chromosome	Gène/Protéine	Modalité	Prévalence	Pathologie	Caractéristiques communes
PARK 1 et PARK 4/4q21-23	α -sinucléine	AD	Très rare	Corps de Lewy	Démences précoces
PARK 2/6q25-27	Parkine	AR (principalement)	18 % des FPMP (50 % avec antécédant familial)	Corps de Lewy rares	Formes précoces, progression lente
PARK 6/1p35-36	PINK-1	AR (risque accru chez les porteurs)	2 à 3 % des FPMP	Inconnue	Formes précoces, progression lente
PARK 7/1p36-8	DJ-1	AR	< à 1 % des FPMP	Inconnue	Formes précoces, progression lente
PARK 8/12p11.2-q13.1	LRRK-2	AD	Très variable (jusqu'à 30 %)	Corps de Lewy, pathologie variable incluant les protéines Tau	Maladie de Parkinson typique (principalement)

Table 7 : Facteurs monogéniques impliqués dans la maladie de Parkinson.

Le tableau récapitule les principaux gènes dont les mutations apparaissent impliquées dans la maladie de Parkinson. *Abréviations* : AD, autosomal dominant ; AR, autosomal récessif ; FPMP, formes précoces de la maladie de Parkinson qui apparaissent en général avant l'âge de 50 ans (d'après Savitt et coll., 2007).

Les facteurs génétiques

Les antécédents familiaux, parfois associés à la maladie de Parkinson et plus particulièrement aux formes les plus précoces (diagnostiquées avant l'âge de 50 ans), suggèrent une contribution génétique dans l'étiologie de cette pathologie. En effet, bien que la plus vaste étude menée à ce jour (Tanner, 1996) n'ait révélé, au-delà de l'âge de 51 ans, aucune différence entre les taux de concordance présentés par des jumeaux monozygotes comparativement à ceux de jumeaux dizygotes, ces taux de concordance sont, en revanche, deux fois plus élevés chez les jumeaux monozygotes en-dessous du seuil de 51 ans. On connaît actuellement dix mutations génétiques au niveau de six gènes différents qui pourraient être impliquées dans l'étiologie de la maladie de Parkinson (Table 7). En 1996, l'équipe de Polymeropoulos a mis en évidence une relation entre une séquence génétique localisée sur le chromosome 4q21-q21 et l'expression du phénotype parkinsonien chez les membres d'une

importante famille de malades dans laquelle la pathologie est transmise sur le mode autosomal. Cette séquence, le locus Park-1, est exprimée au niveau du gène dominant *SNCA* qui code la principale protéine contenue dans les corps de Lewy (*cf.* chapitre précédent) : l' α -synucléine. Les mutations de ce gène ont pour conséquence une augmentation du taux d'agrégation de l' α -synucléine en protofibrilles, oligomères formant des complexes fibrillaires insolubles hyperphosphorylés et ubiquitinisés (Spillantini et coll., 1998 ; Hasegawa et coll., 2002), qui pourraient représenter une forme toxique de cette protéine (Rochet et coll., 2004). Par la suite, d'autres mutations ont également été impliquées (de Park-2 à Park-10), au niveau d'allèles dominants des gènes *UCH-L1* et *LRRK2* ou récessifs des gènes *PARK2*, *DJ-1* et *PINK-1*. Les mutations du gène *PARK2*, incluant des délétions d'exon, des duplications, des insertions et une variété d'altérations « faux sens », constituent le facteur génétique le plus fréquemment observé dans les formes précoces de la maladie. Des formes mutées de la parkine sont, en effet, rencontrées chez près de 50 % des malades pour lesquels la pathologie est diagnostiquée précocement selon un mode récessif et autosomal et dans près de 15 à 20 % des cas précoces ne présentant aucun antécédent familial (Kubo et coll., 2006). Le gène *PARK2* code la parkine, une ligase dont la fonction consiste à marquer d'autres protéines en y ajoutant des molécules d'ubiquitine. Les protéines ainsi marquées peuvent ensuite être prises en charge par le protéasome, une unité multi-catalytique responsable de la dégradation de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la transduction du signal ou l'apoptose (*pour revue* : Sun et coll., 2007). Les mutations du gène *LRRK2*, codant une kinase riche en leucine (en anglais « *leucin-rich repeat kinase 2* »), pourraient également être d'un grand intérêt puisqu'il a récemment été mis en évidence, au sein d'une population de juifs ashkénazes, qu'elles sont présentes chez 18 % des sujets atteints de façon précoce ou non, et chez 30 % des malades ayant un antécédent familial unique (Ozelius et coll., 2006). Le gène *PINK-1* code, quant à lui, une protéine mitochondriale à activité kinasique (en anglais

« *PTEN-induced kinase 1* ») qui pourrait être impliquée dans la protection des cellules en situation de stress, bien qu'on ne lui connaisse pas encore de substrat (Silvestri et coll., 2005). Le gène *UCH-L1* code une enzyme, l'hydrolase l'ubiquitine-C-terminale L1 (en anglais, « ubiquitin-C-terminal hydrolase L1 »), qui est présente dans les corps de Lewy et pourrait promouvoir « l'ubiquitination » de l' α -synucléine. Les mutations de ce gène affecteraient ainsi la fonction protéosomale. Néanmoins, des doutes subsistent quant à l'implication des mutations du gène *UCH-L1* dans la maladie de Parkinson (Healy et coll., 2006). Le rôle de la protéine codée par le gène *DJ-1* reste méconnu, bien que des fonctions de détection du stress oxydatif, de protéine chaperonne et/ou de protéase aient été proposées (Moore et coll., 2005). Il semble, en outre, que les mutations récessives de l'oncogène *DJ-1* ne soient impliquées que dans moins de 1 % des cas précoces de la maladie de Parkinson.

Les facteurs environnementaux

L'absence de différence, observée au-delà de 51 ans, entre les taux de concordance présentés par des jumeaux monozygotes par rapport à des jumeaux dizygotes et l'identification de facteurs de risques environnementaux ont suggéré l'hypothèse d'une étiologie exogène de la maladie de Parkinson. Les études épidémiologiques ont confirmé cette hypothèse en démontrant des corrélations entre l'occurrence de cette pathologie et des facteurs tels que l'exposition à des pesticides ou à des métaux lourds, des traumatismes crâniens ou encore le mode de vie (*pour revue* : Khandhar et coll., 2007). L'hypothèse d'une exposition à des pesticides résulte indirectement de la mise en évidence, au début des années 1980, des propriétés de la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydro-pyridine (MPTP), un composé provoquant un syndrome parkinsonien typique (*cf.* chapitre 1.3.2.2). La découverte de substances ayant une structure analogue au MPTP (telles que le paraquat, le duquat ou la

roténone) dans des herbicides et pesticides synthétisés par l'industrie agronomique suggéra alors qu'une exposition à ces produits pourrait constituer un facteur de risque de la maladie de Parkinson. Cette hypothèse est confirmée, chez le Rat, où la roténone provoque un syndrome parkinsonien caractérisé par la dégénérescence des neurones nigro-striataux (Greenamyre et coll., 1999), ainsi que chez l'Homme où la majorité des études épidémiologiques indique l'existence d'un facteur de risque (*pour revue* : Lai et coll., 2002). Une plus grande prévalence de la maladie de Parkinson chez les agriculteurs, particulièrement exposés à ces produits, et plus généralement dans les zones rurales des pays industrialisés, où l'importante utilisation de ces herbicides et pesticides pourrait augmenter leur concentration dans les eaux de ruissellement, a été également rapportée (*pour revue* : Lai et coll., 2002). Les relations entre le développement de la maladie de Parkinson chez l'Homme et certains pesticides spécifiques, les modalités d'action de l'agent toxique, ou encore la durée de l'exposition restent, en revanche, controversées. Une corrélation significative entre le développement de la maladie de Parkinson et l'exposition au manganèse et au cuivre a, en outre, été mise en évidence chez des patients ayant été en contact avec des métaux pendant plus de 20 ans (Gorell et coll., 1999). Le mécanisme par lequel ces expositions pourraient être à l'origine de la maladie de Parkinson reste cependant obscur. Leur pertinence par rapport à l'occurrence de la maladie est par ailleurs inconnue. De manière intéressante, une corrélation négative a été mise en évidence entre la consommation de tabac et le développement de la maladie de Parkinson dont l'incidence est en effet significativement réduite chez les fumeurs, et plus particulièrement chez les gros fumeurs (*pour revue* : Tanner & Aston, 2000). En revanche, le mécanisme neuroprotecteur par lequel la consommation de tabac pourrait prévenir le développement de la maladie de Parkinson demeure inconnu. Une corrélation entre les traumatismes crâniens et la maladie de Parkinson a été également évoquée, mais elle reste controversée (*pour revue* : Lai et coll., 2002). Les données cliniques indiquent, en revanche,

que la maladie de Parkinson peut préférentiellement se développer chez les anciens boxeurs (Davie et coll., 1995), suggérant que des traumatismes sévères et/ou répétés pourraient avoir une incidence sur le développement de la pathologie sans que leur survenue soit nécessairement déterminante. Enfin, l'influence de maladies infectieuses (contractées dès le stade intra-utérin ou pendant l'enfance) et de facteurs alimentaires (tels que la consommation de café ou de vitamines) a été également évoquée (*pour revue* : Lai et coll., 2002).

L'idée que la maladie de Parkinson résulterait d'évènements déclencheurs (d'origine génétique ou environnementale) uniques et indépendants a longtemps prévalu. Cette notion est cependant remise en cause pour ce qui concerne les facteurs génétiques puisque seulement 2 à 3 % des cas idiopathiques semblent provenir d'un facteur génétique unique (*pour revue* : Klein & Schlossmacher, 2007). En outre, il a récemment été détecté, chez un patient atteint d'une forme précoce de la maladie de Parkinson, l'existence d'une hérédité « digénique » associant deux mutations « faux sens » au niveau des gènes *DJ-1* et *PINK-1* (Tang et coll., 2006). De manière intéressante, la co-expression de ces deux mutations dans un modèle de culture cellulaire s'est avérée potentialiser la toxicité du MPP⁺, suggérant l'hypothèse que la maladie de Parkinson puisse résulter de plusieurs évènements génétiques. Néanmoins, il apparaît peu probable que la survenue d'évènements génétiques, même multiples, puisse à elle seule rendre compte de la majorité des cas pathologiques, ce qui vaut par ailleurs également pour les facteurs environnementaux. Ainsi, il a récemment été proposé que la maladie de Parkinson pourrait résulter d'une conjonction d'évènements génétiques et environnementaux multiples (*pour revue* : Klein & Schlossmacher, 2007 ; Figure 20). Cette étiologie complexe semble confortée d'un point de vue expérimental par une étude indiquant que le risque de développer la maladie de Parkinson peut être simultanément influencé par l'état du gène mitochondrial *CYP2D6* et l'exposition à des pesticides (Elbaz et coll., 2004).

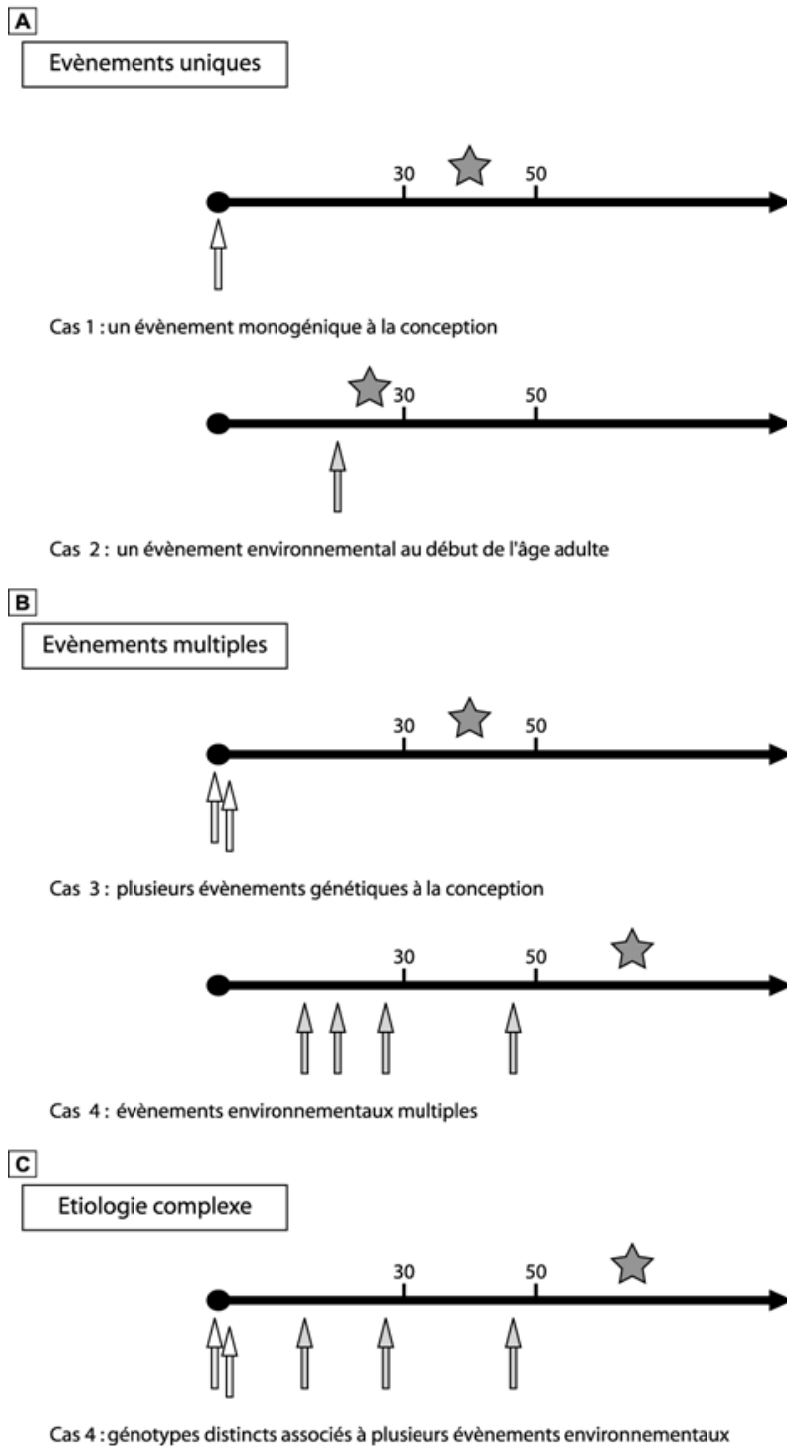


Figure 20 : Hypothèse d'évènements génétiques et environnementaux multiples dans l'étiologie de la maladie de Parkinson.

(A) Bien que relativement rares (2 à 3 % des cas idiopathiques), certains évènements génétiques uniques apparaissent impliqués dans la maladie de Parkinson (*cas 1*). De même, l'exposition à un facteur environnemental unique, tel la toxine MPTP, peut induire le développement de la pathologie (*cas 2*). (B) Récemment, un cas de double mutation hétérozygote a été mis en évidence chez un patient parkinsonien, suggérant la possibilité d'une multiplicité d'évènements génétiques (*cas 3*). L'hypothèse d'évènements environnementaux multiples a également été évoquée (*cas 4*). (C) Par ailleurs, des données expérimentales indiquent que la maladie de Parkinson pourrait résulter d'évènements génétiques et environnementaux multiples (*cas 5*), suggérant une étiologie complexe (d'après Klein & Schlossmacher, 2007).

1.3.1.3 APPROCHES THÉRAPEUTIQUES

À ce jour, il n'existe aucun agent « neuroprotecteur » capable de freiner la dégénérescence des neurones dopaminergiques mésencéphaliques. Les traitements disponibles sont tous symptomatiques. La plupart des stratégies thérapeutiques mettent en jeu des traitements pharmacologiques. Néanmoins, les techniques chirurgicales telles que les stimulations à haute fréquence (SHF) du noyau sous-thalamique ou du segment interne du globus pallidus constituent des options intéressantes lorsque les médicaments ne sont plus efficaces ou le sont au prix d'intenses effets adverses.

a) Approches pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques de la maladie de Parkinson ont connu une avancée majeure à la fin des années 1960 avec l'introduction de la L-DOPA dans la pharmacopée (Cotzias et coll., 1969). Cette stratégie permet de compenser la carence en dopamine, améliorant grandement la qualité de vie des patients. Cependant, elle n'arrête pas la progression de la maladie et, au long cours, donne lieu à l'apparition d'effets indésirables caractérisés par des fluctuations motrices et des mouvements anormaux involontaires (*pour revue* : Brotchie et coll., 2005). Plus tard, l'utilisation d'agonistes dopaminergiques directs, en synergie avec la L-DOPA, a permis de moduler et de réduire les fluctuations motrices liées à ce traitement. Bien qu'à ce jour la L-DOPA reste le traitement pharmacologique le plus utilisé chez les patients parkinsoniens, des traitements non dopaminergiques ont également été développés.

Les agents dopaminergiques

La L-DOPA, précurseur direct de la dopamine, est, contrairement à cette dernière, capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Sa prise quotidienne permet d'accroître la synthèse de dopamine grâce à l'activité enzymatique endogène de la DOPA-décarboxylase, enzyme également périphérique. Quand la L-DOPA est transformée en dopamine à la périphérie, le passage de cette dernière dans le compartiment cérébral est alors impossible et des effets indésirables apparaissent (hypotension artérielle à faibles doses, hypertension à fortes doses, nausées et vomissements). C'est pourquoi le traitement par la L-DOPA (Modopar[®], Sinemet[®]) est généralement associé à des inhibiteurs de l'activité dopa-décarboxylase périphérique, comme le bensérazide ou la carbidopa. Ces substances réduisent considérablement les effets secondaires liés à la formation périphérique de dopamine et permettent, en outre, d'accroître sa disponibilité centrale et de réduire ainsi les doses prescrites. Il a été initialement envisagé que les complications motrices résultant de la prise au long cours du traitement par la L-DOPA pourraient être principalement liées à une stimulation non physiologique des récepteurs dopaminergiques. En effet, lorsque la perte croissante des neurones dopaminergiques devient trop importante, la L-DOPA ne peut plus abondamment augmenter le stockage vésiculaire de dopamine au sein des terminaisons de ces neurones. Compte tenu de la demi-vie relativement brève de la L-DOPA (de 60 à 90 min), la concentration en dopamine devient fluctuante et ne permet plus d'assurer une stimulation durable des récepteurs dopaminergiques (*pour revue* : Rezak, 2007). Ainsi, après plusieurs années d'évolution de la maladie, il faut souvent recourir à un fractionnement des doses de L-DOPA. Ces mesures sont néanmoins rarement efficaces et toutes les stratégies déployées dans la recherche de nouveaux traitements ont généralement eu pour but de maintenir une imprégnation permanente de la L-DOPA au niveau central, afin d'assurer la stabilité du tonus

dopaminergique striatal, notamment grâce à des agonistes dopaminergiques ayant des demi-vies plus longues ou à des inhibiteurs enzymatiques.

Parmi les inhibiteurs enzymatiques, la sélégiline (Deprenyl[®]) a été commercialisée dès le début des années 1980. Cette molécule inhibe sélectivement et irréversiblement les MAO-B intra- et extracellulaires, réduisant ou retardant ainsi la dégradation de la dopamine en DOPAC. Ce produit traverse relativement bien la barrière hémato-encéphalique et possède une demi-vie plasmatique de l'ordre de 40 heures (*pour revue* : Munchau & Bhatia, 2000). Un effet neuroprotecteur de la sélégiline a été initialement suggéré. Bien que largement débattu, cet effet est incertain. En outre, la sélégiline possède une efficacité symptomatique relativement modérée (*pour revue* : Rezak, 2007). La rasagiline (Azilect[®]), disponible depuis un peu plus d'un an sur le marché américain, est un inhibiteur de la MAO-B significativement plus puissant. Cette molécule présente des effets prometteurs dans le traitement symptomatique, aussi bien lorsqu'elle est utilisée seule ou en conjonction avec la L-DOPA (*pour revue* : Rezak, 2007).

En présence de carbidopa, la L-DOPA administrée oralement peut également être métabolisée en 3-O-méthyl-dopa (3-OMD), un métabolite inactif de la dopamine, par la COMT présente au niveau périphérique (dans le tractus gastro-intestinal, le foie, les hématies, ...). L'addition d'un inhibiteur de la COMT dans le traitement de la maladie de Parkinson permet, par conséquent, d'inhiber le métabolisme périphérique de la L-DOPA, prolongeant ainsi sa demi-vie plasmatique et augmentant de ce fait sa biodisponibilité centrale (Kaakkola et coll., 1994). Deux inhibiteurs sélectifs de la COMT ont été développés et mis sur le marché de manière relativement récente : le tolcapone (Tasmar[®]) et l'entacapone (Comtan[®]). Ces deux molécules induisent une réduction d'environ 40 % des fluctuations motrices de la période « OFF » et une augmentation de la proportion (+ 25 %) ou de la durée (de 30 à 60 minutes) des périodes « ON » durant lesquelles le traitement L-DOPA est bénéfique (*pour revue* : Rezak, 2007).

Cependant, l'innocuité de la tolcapone a récemment été remise en cause par la *Food and Drug Administration* (FDA), organisme ayant, entre autres, le pouvoir d'autoriser la commercialisation des médicaments sur le territoire des États-Unis d'Amérique. En effet, son utilisation a été associée à plusieurs décès résultant d'une nécrose hépatique. Bien qu'aucun décès n'ait été déploré aux U.S.A. depuis l'instauration d'un protocole de mesure des enzymes hépatiques (Olanow, 2000), cette molécule a été retirée du marché dans de nombreux pays, notamment en Europe.

Les agonistes dopaminergiques utilisés dans le traitement de la maladie de Parkinson ont pour vocation de mimer les effets naturels de la dopamine en interagissant directement avec ses récepteurs. Les agonistes dopaminergiques de « première génération », dérivés de l'ergot de seigle et encore appelés « ergolines », incluent la bromocriptine (Parlodel[®]), le pergolide (Celance[®]), le lisuride (Dopergine[®]) et la cabergoline (Dostinex[®]). La bromocriptine et le lisuride sont rarement utilisés dans la maladie de Parkinson tandis que la cabergoline est employée dans le traitement de l'hyperprolactinémie. En ce qui concerne le pergolide, son administration a été récemment associée à l'induction de fibroses des valves cardiaques et son utilisation a, par conséquent, été très relativisée. Les agonistes dérivés de l'ergot de seigle ont, en outre, des propriétés α -adrénergiques ou sérotoninergiques, responsables de nombreux effets indésirables (nausée, vomissement, hypotension, confusion, hallucination, insomnie). Les agonistes de « seconde génération », composés synthétiques plus récents et plus sélectifs des récepteurs D₂, sont, par exemple, le pramipexole (Mirapex[®], U.S.A.), le ropinirole (Requip[®]), le piribédil (Trivastal[®]) et la rotigotine (Neupro[®], U.S.A.). Le pramipexole et le ropinirole constituent les molécules les plus prescrites, généralement en complément de la L-DOPA afin de réduire les fluctuations motrices mais ils peuvent aussi être utilisés en monothérapie, particulièrement au début de la maladie où leur bénéfice clinique est équivalent (*pour revue* : Rezak, 2007). Ainsi, cinq ans après le début du traitement de la maladie, 34 %

des patients sont encore sous monothérapie aux agonistes dopaminergiques (Rascol et coll., 2000). Néanmoins, lorsque la maladie progresse, le traitement doit être complété par l'administration de L-DOPA. Malgré leur meilleure sélectivité, le pramipexole et le ropinirole ne sont pas dépourvus d'effets secondaires. Des troubles du sommeil, une hypotension, des troubles cognitifs, psychiatriques ou des comportements compulsifs ont ainsi été évoqués. La rotigotine a été approuvée en mai 2007 par la *FDA* comme agoniste dopaminergique pour le traitement de la maladie de Parkinson. La particularité de cette molécule est qu'elle peut être administrée de manière transdermique et continue, grâce à un « *patch* » quotidien.

Les agents non dopaminergiques

Un potentiel thérapeutique des antagonistes glutamatergiques a été proposé dans le cadre de la maladie de Parkinson, en raison de données expérimentales indiquant que l'expression des récepteurs NMDA est augmentée chez le patient parkinsonien ainsi que chez le singe lésé au MPTP et traité par la L-DOPA (*pour revues* : Brotchie et coll, 2005 ; Deogaonkar & Subramanian, 2005). L'amantadine (Mantadix[®]), qui bloque les récepteurs NMDA, a été initialement développée dans une perspective antivirale. Elle s'est, néanmoins, avérée très active dans le traitement de la maladie de Parkinson, mais sur une période brève. Les bénéfices apportés par l'amantadine sont plus importants dans les stades précoces de la maladie et semblent avoir un meilleur impact sur les tremblements. Les effets de l'amantadine suggèrent une hyperactivation du système glutamatergique dans la maladie de Parkinson, laquelle est potentiellement neurotoxique et pourrait être impliquée dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Les effets secondaires induits par l'amantadine incluent des modifications de l'état mental, des œdèmes des extrémités inférieures ou un livedo reticularis

(coloration bleue-violacée de la peau, touchant essentiellement le tronc, les jambes et les avant-bras).

Les anticholinergiques ont été les premières molécules utilisées dans le traitement de la maladie de Parkinson, la teinture de belladone notamment. L'utilisation de l'atropine, dérivé alcaloïde de cette dernière, a été introduite en France vers 1870 par Charcot, qui, faisant l'hypothèse que la maladie de Parkinson pourrait correspondre à l'expression d'une hypercholinergie (en raison de la salivation excessive observée chez de nombreux patients), l'avait essayée et en avait remarqué l'effet bénéfique sur les tremblements. Les dérivés synthétiques de l'atropine, mieux tolérés, sont apparus dans les années 1950, et ont constitué l'essentiel du traitement pharmacologique de la maladie de Parkinson avant l'avènement de la L-DOPA. Leur action passe par une réduction de l'hyperactivité cholinergique striatale résultant de la baisse du tonus inhibiteur dopaminergique. Ils agissent préférentiellement sur la rigidité et le tremblement (*pour revue* : Rezak, 2007). Cependant, en raison de leurs effets secondaires (glaucome, constipation, confusion mentale), les anticholinergiques comme le trihexyphénidyl (Artane[®]) ou la tropatépine (Lepticur[®]) sont désormais plus rarement utilisés et, quand ils le sont, c'est généralement à faibles doses et chez les sujets jeunes.

b) Approches chirurgicales

Les thérapies lésionnelles

Les traitements neurochirurgicaux de la maladie de Parkinson ont débuté de manière empirique, bien avant l'avènement de l'ère de la L-DOPA, grâce à un pionnier de la neurochirurgie, Victor Horsley qui, dès le début XX^{ème} siècle, essaya de soulager certains symptômes de cette pathologie en procédant à l'ablation sélective de différentes aires

corticales. Ces techniques ne se sont néanmoins répandues que dans les années 1950, avec la pallidotomie ou la thalamotomie (*pour revue* : Cozzens, 2007). Les lésions du noyau ventral intermédiaire du thalamus sont particulièrement efficaces en ce qui concerne les tremblements mais, d'une manière générale, la thalamotomie n'améliore pas la bradykinésie ou l'akinésie et peut, au contraire, exacerber les troubles de la démarche et du langage (*pour revue* : Walter & Vitek, 2004). De nombreuses études ont depuis montré l'efficacité de la thermo-coagulation du segment interne du globus pallidus (GPi) dans l'amélioration des principaux symptômes de la maladie de Parkinson (*pour revue* : Cozzens, 2007). L'emplacement de la lésion apparaît être le facteur déterminant dans le niveau de bénéfices résultant de l'opération. Si la lésion est trop petite, elle peut être complètement inefficace et une seconde lésion s'avère parfois impossible. Si la lésion est trop grande, elle peut produire des effets invalidants irréversibles. Dans environ 30 % des cas apparaissent ainsi des effets néfastes, tels qu'une paralysie faciale, une dégradation de la parole, une perte de champ visuel ou encore une confusion, qui restent permanents dans 14 % des cas (Hariz & Bergenheim, 2001). Les lésions bilatérales sont généralement évitées en raison des risques de dysarthrie (difficulté d'élocution) et de dysphagie. Bien que la pallidotomie ne soit pas fréquemment employée, elle présente l'avantage, par rapport aux autres techniques chirurgicales, d'avoir de faibles coûts de mise en œuvre et de suivi.

La stimulation cérébrale à haute fréquence

En dépit de leurs effets secondaires potentiellement néfastes, notamment en ce qui concerne les modalités bilatérales, les bénéfices indiscutables apportés par les lésions thalamiques ont incité de nombreux auteurs à rechercher des techniques chirurgicales alternatives. La stimulation à haute fréquence (SHF), technique initialement utilisée dans les années 1960

pour localiser le thalamus avant son ablation chirurgicale, avait été testée dès le début des années 1980 au niveau du noyau ventromédian intermédiaire du thalamus, mais avec des résultats en « demi-teinte ». En effet, la stimulation thalamique ne s'est, par la suite, révélée efficace que sur les tremblements associés à la maladie de Parkinson et, bien que réversibles, elle n'est pas exempte d'effets secondaires telle qu'une dysarthrie observée chez environ 20 % des patients (*pour revue* : Walter & Vitek, 2004). Au cours de la période faste des lésions pallidotomiques, Siegfried & Lippitz (1994) ont décrit l'efficacité d'une stimulation bilatérale du segment interne du globus pallidus dans le traitement de trois patients parkinsoniens. Bien que cette stimulation apparaisse efficace dans le traitement de tous les symptômes parkinsoniens (akinésie, bradykinésie, rigidité, tremblement, posture, dyskinésies), les effets bénéfiques ont tendance à décliner avec le temps (*pour revue* : Walter & Vitek, 2004). Simultanément, des travaux effectués au Centre Hospitalo-Universitaire de Grenoble ont également mis en évidence les bénéfices d'une stimulation du noyau sous-thalamique (NST) dans le traitement de la maladie de Parkinson (Pollak et coll., 1993). De manière similaire aux

	Thalamus		Glopus pallidus interne		Noyau sous-thalamique	
	Lésion	SHF	Lésion	SHF	Lésion	SHF
Effets symptomatiques						
Bradykinésie	-	-	+	++	+	++
Tremblement	++	++	+	+	+	++
Rigidité	+	+	+	+	+	++
Dyskinésies	+/-	+/-	++	++	+	++
Réduction des doses de traitement						
	-	-	-	-	+	++

Table 8 : Récapitulatif des principales caractéristiques des techniques chirurgicales utilisées dans le traitement de la maladie de Parkinson.

Abréviations: SHF, stimulation à haute fréquence ; -, aucun effet ; +/-, effet variable ; +, amélioration modérée ; ++, forte amélioration (d'après Thobois et coll., 2005).

résultats obtenus au niveau pallidal, la stimulation du NST améliore également tous les symptômes associés à cette pathologie. Quelques complications motrices ont été décrites, mais, comme au niveau pallidal, ces effets secondaires peuvent être aisément supprimés en modifiant les paramètres de stimulation. En revanche, la stimulation du NST permet de réduire, voire dans certains cas de supprimer, les doses quotidiennes de médicaments dopaminergiques prescrits aux patients (*pour revue* : Thobois et coll., 2005 ; Table 8). Néanmoins, quelques effets indésirables d'ordre cognitif et émotionnel (tels qu'une dépression) ont été rapportés (*pour revue* : Walter & Vitek, 2004).

Perspectives thérapeutiques

En plus des approches chirurgicales basées sur des techniques ablatives et électrophysiologiques, ces dix dernières années ont vu émerger des stratégies très prometteuses reposant sur la transplantation de cellules-souches et la thérapie génique.

L'idée de traiter la maladie de Parkinson en procédant au remplacement des neurones dopaminergiques n'est pas récente (Perlow et coll., 1979). D'abord étudiée chez l'animal, la transplantation de cellules mésencéphaliques fœtales dans le striatum a été tentée pour la première fois chez le patient parkinsonien au milieu des années 1980 (Backlund et coll., 1985). Bien que les premiers essais aient été positifs, des études ultérieures, élargies à un nombre de patients supérieur, n'ont montré aucune amélioration significative du comportement moteur. En outre, ces études ont également indiqué un faible taux de survie des greffes ainsi qu'une augmentation de la morbidité et de la mortalité (*pour revue* : Walter & Vitek, 2004). L'utilisation des techniques stéréotaxiques, en remplacement des craniotomies encore pratiquées à l'époque, a néanmoins amélioré ces deux pronostics. Des résultats plus encourageants ont été obtenus plus récemment puisque des greffes réussies ont été observées

post mortem chez certains patients, dans deux études menées en « double aveugle ». En revanche, ces expériences, effectuées à partir d'un large échantillon (74 patients), n'ont révélé aucune amélioration clinique 12 à 24 mois après l'intervention (Freed et coll., 2001 ; Olanow et coll., 2003). Seul un léger bénéfice a été observé dans l'une des deux études, chez les patients âgés de moins de 60 ans mais 15 % d'entre eux développèrent un an plus tard des dyskinésies et des dystonies (Freed et coll., 2001). L'apparition de dyskinésies sévères fut en outre confirmée dans 15 à 56 % des cas (Olanow et coll., 2003), laissant supposer que les greffes ne permettent pas une restauration fonctionnelle de la transmission dopaminergique striatale. Néanmoins, la transplantation de cellules-souches embryonnaires en est encore à ses balbutiements et la récente démonstration chez l'animal que certaines de ces cellules ont la capacité de se différencier en neurones dopaminergiques fonctionnels est par exemple très encourageante (*pour revue* : Walter & Vitek, 2004).

L'utilisation de facteurs neurotrophiques a été proposée afin de promouvoir le rétablissement et le maintien des neurones dopaminergiques en cours de dégénérescence. *In vitro*, le GDNF (« *glial cell line-derived neurotrophic factor* ») apparaît, en particulier, capable de stimuler spécifiquement la survie et le bourgeonnement des neurones dopaminergiques (Lin et coll., 1993). Des résultats positifs ayant été obtenus lors d'essais précliniques effectués à partir de modèles animaux de la maladie de Parkinson, des essais cliniques d'administration du GDNF par infusion intra-ventriculaire (Nutt et coll., 2003) ou intra-striatale (Gill et coll., 2003) ont été réalisés. Aucun bénéfice moteur n'a été observé huit à vingt mois après une infusion intra-ventriculaire mensuelle de GDNF. En revanche, son infusion intra-striatale, effectuée de manière quotidienne à l'aide d'une pompe, a entraîné au bout d'un an une amélioration des symptômes moteurs classiquement associés à la pathologie, permettant, en outre, une réduction de la médication. De plus, une augmentation de la capture de [¹⁸F]-dopamine a également été mise en évidence par tomographie par émission de positons (TEP), suggérant

un effet trophique du GDNF sur la fonctionnalité des terminaisons dopaminergiques. Plus récemment, il a été envisagé une nouvelle stratégie visant à transférer directement l'ADN complémentaire du gène codant le GDNF à l'aide de vecteurs viraux (adénovirus ou lentivirus). Les études précliniques sont prometteuses car elles démontrent, par exemple, que l'injection intra-striatale d'une solution d'adénovirus exprimant l'ADNc du gène du GDNF humain prévient la dégénérescence et les déficits comportementaux induits, chez le Rat, par la lésion des neurones nigro-striataux (*pour revue* : Kirik et coll., 2004). Il a par ailleurs été mis en évidence que l'injection striatale de vecteurs lentiviraux exprimant l'ADNc du gène GDNF est également capable de réprimer les troubles moteurs induits, chez les rongeurs et les primates, par une déafférentation dopaminergique expérimentale (*pour revue* : Kirik et coll., 2004).

1.3.2 LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le traitement pharmacologique de la maladie de Parkinson par la L-DOPA, qui constitue de loin la stratégie thérapeutique la plus fréquemment utilisée, n'est pas parfait car il provoque, au long cours, des effets indésirables chez la majorité des patients. D'un point de vue clinique, les complications motrices associées à ce traitement peuvent être distinguées en troubles hypo- et hyperkinétiques. Les troubles hypokinétiques, encore appelés « fluctuations motrices », sont principalement caractérisés par les phénomènes de « détérioration de fin de dose » (ou « *wearing off* » en anglais) qui correspondent à une aggravation de la symptomatologie motrice résultant de la diminution progressive de la durée des effets bénéfiques du traitement. Ces troubles se produisent tout d'abord de manière prévisible, mais plus la maladie progresse et plus ils surviennent de manière inattendue, le comportement moteur des patients fluctuant alors entre un état mobile (« *on* » en anglais) entrecoupé de phases d'immobilité (« *off* » en anglais). Ce phénomène dit

de « yo-yo » (« *on/off* » en anglais) est caractérisé par des phases d'immobilité de plusieurs minutes au cours desquelles le patient peut se figer, chuter, se rigidifier et, parfois, développer un comportement similaire aux attaques de panique. Au fur et à mesure de la progression de la maladie, d'autres troubles hypokinétiques peuvent être observés, comme une akinésie matinale, mais leur lien avec le traitement n'est pas établi. Les troubles hyperkinétiques résultant du traitement à long terme par la L-DOPA s'illustrent par l'apparition de mouvements involontaires et anormaux encore appelés dyskinésies. Contrairement aux fluctuations, ces troubles moteurs sont particulièrement invalidants. Les dyskinésies sont, en outre, les complications motrices les plus précocement et les plus fréquemment induites par la L-DOPA (*pour revues* : Nutt, 1990 ; Brotchie et coll., 2005 ; Deogaonkar & Subramanian, 2005).

1.3.2.1 PHÉNOMÉNOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA

Les dyskinésies provoquées par la L-DOPA chez le patient parkinsonien apparaissent après une « période d'induction » et rarement en début de traitement. L'administration de fortes doses de L-DOPA favorise leur développement et potentialise leur sévérité (Metman et coll., 1997), laquelle est relativement variable d'un patient à l'autre. La phénoménologie des dyskinésies induites par la L-DOPA est particulièrement riche et complexe puisqu'elles peuvent se caractériser par une mosaïque de mouvements involontaires, empruntés aux répertoires choréique, athétosique (mouvements lents et ondulants touchant principalement les extrémités du corps), dystonique, stéréotypique ou myoclonique (*pour revues* : Brotchie et coll., 2005 ; Deogaonkar & Subramanian, 2005). Une fois le processus physiopathologique installé, les patients peuvent exprimer deux types de dyskinésies (LID ou DID pour l'anglais « *L-DOPA-induced dyskinesia* » ou « *drug-induced dyskinesia* ») : les dyskinésies de pic de

dose (en anglais « *peak-dose dyskinesia* ») et les dyskinésies biphasiques (D-1-D, de l'anglais « *dyskinesia-improvement-dyskinesia* »). Les dyskinésies de pic de dose, qui sont de loin les plus fréquentes (Blanchet et coll., 1996), apparaissent, comme leur nom l'indique, au moment où la concentration plasmatique en L-DOPA est la plus forte et donc quand l'effet anti-parkinsonien est maximal. Elles sont principalement choréiformes (mouvements brefs et saccadés affectant principalement les membres) mais des mouvements d'origine dystonique (caractérisées par des contractions musculaires douloureuses et déformantes) peuvent également apparaître. Néanmoins, l'influence du traitement par la L-DOPA dans la mise en place des dystonies n'est pas formellement établie, puisque des mouvements dystoniques, dépourvus de toute expression choréique, sont communément observés au cours du développement de la maladie elle-même (Martignoni et coll., 2003). Les dyskinésies biphasiques surviennent au début et à la fin de l'effet anti-parkinsonien (lorsque les concentrations plasmatiques en L-DOPA sont en hausse ou en baisse). Elles peuvent être également de nature choréique et/ou dystonique. La période à laquelle surviennent les dyskinésies s'allonge progressivement au fil du temps, jusqu'à recouvrir complètement celle pendant laquelle persiste une amélioration significative des symptômes parkinsoniens (en anglais « *square wave dyskinesia* »).

D'un point de vue physiopathologique, le modèle fonctionnel classique prédit que les mouvements dyskinétiques induits par la L-DOPA sont associés à une hypoactivité anormale des structures de sortie des ganglions de la base. L'état parkinsonien est caractérisé par une dégénérescence des neurones de la voie dopaminergique nigro-striatale qui, de par l'effet inhibiteur des récepteurs D₂, conduit à une hyperactivité des neurones GABAergiques de la voie striato-pallidale indirecte, avec comme conséquence une hypoactivité du GPe. Les neurones du GPe se projetant vers le NST étant également de nature GABAergique, il en résulte une hyperactivité des neurones glutamatergiques innervant le GPi et la SNr. Dans le

même temps, la raréfaction de la dopamine réduit l'activation des neurones GABAergiques de la voie striato-pallidale directe, qui renforce à son tour l'hyperactivité des structures de sortie des ganglions de la base. Cette hyperactivité du GPi et de la SNr provoque une inhibition excessive du thalamus et du cortex moteur, responsable de l'akinésie caractéristique du parkinsonisme (Figure 21). La L-DOPA thérapie a pour but de normaliser l'activité du GPi, en inversant les effets exercés par les voix directe et indirecte. Ainsi, l'effet anti-parkinsonien de la L-DOPA est supposé diminuer l'hyperactivité du GPi. Selon ce principe, les modèles fonctionnels généralement évoqués pour rendre compte des dyskinésies induites par la L-

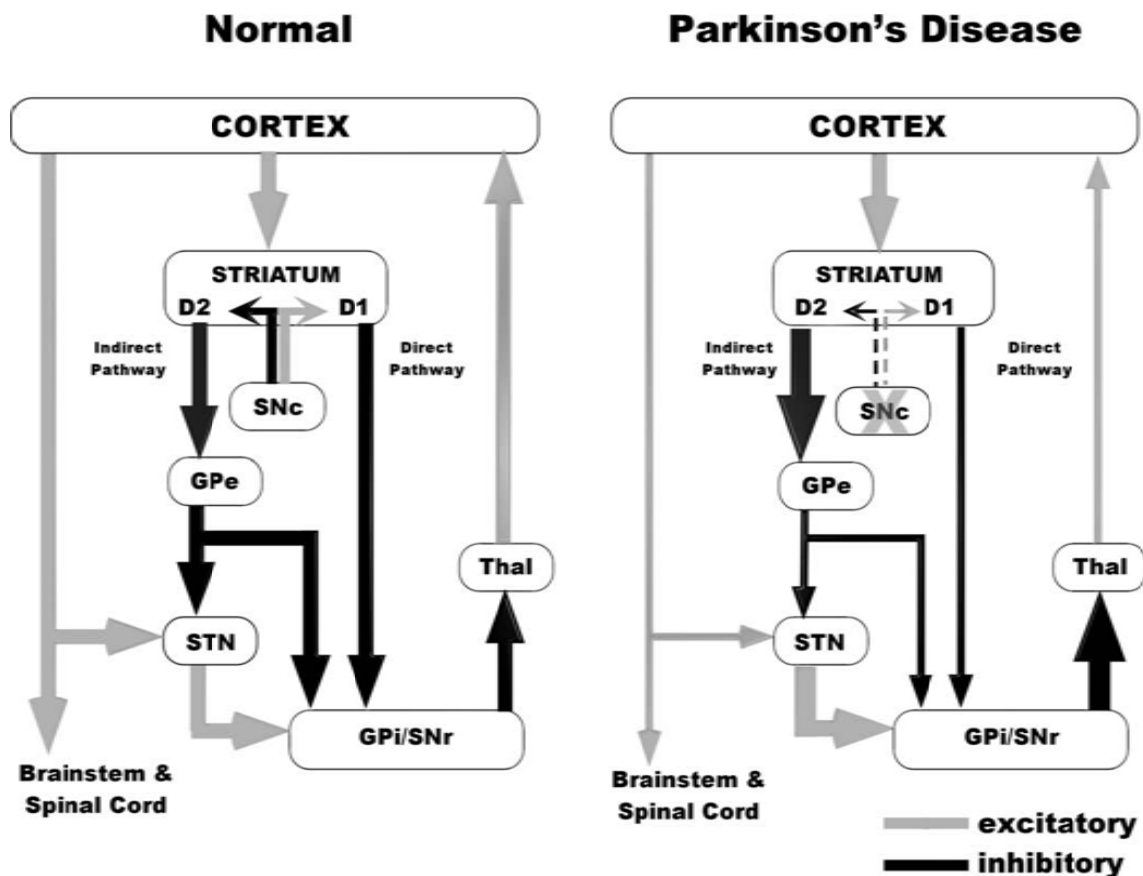


Figure 21 : Représentation schématique du modèle anatomo-fonctionnel classique dans le contexte de la maladie de Parkinson.

L'activité des voies directe et indirecte, illustrées par des flèches, est différemment affectée par la perte des neurones dopaminergiques nigro-striataux. Les récepteurs dopaminergiques sont représentés par les sigles D1 et D2. Les lignes plus épaisses représentent une augmentation de l'activité neuronale alors que celles plus étroites symbolisent une inhibition. *Abréviations* : GPe, globus pallidus externe ; GPi, globus pallidus interne ; STN, noyau sous-thalamique ; SNr, substance noire pars reticulata ; SNc, substance noire pars compacta ; Thal, thalamus (d'après *Walter et coll., 2005*).

DOPA suggèrent une diminution excessive de l'activité du GPi, qui désinhiberait fortement le thalamus et augmenterait ainsi anormalement l'activité du cortex moteur, avec comme conséquence l'expression de mouvements excessifs (Figure 21). En accord avec cette hypothèse, les données électrophysiologiques indiquent que les dyskinésies induites par la L-DOPA sont associées à une diminution excessive de l'activité du GPi (*pour revue* : Walter et coll., 2005). En outre, certaines études ont mis en évidence que des lésions du NST, dont l'action sur le GPi est inhibitrice, induisent l'apparition de dyskinésies chez le primate (*pour revue* : Thobois et coll., 2005). De même, la stimulation à haute fréquence du NST réduit les dyskinésies induites par la L-DOPA thérapie (*pour revue* : Pahwa et coll., 2006). En revanche, les données indiquant que des lésions du GPe aggravent les dyskinésies au lieu de les abolir s'opposent fortement au modèle fonctionnel classique (*pour revue* : Walter et coll., 2005). De manière intéressante, des données électrophysiologiques obtenues à partir de cellules uniques ont suggéré une modification du mode de décharge des neurones du GPi et du NST chez le primate et le patient parkinsonien dyskinétiques (Papa et coll., 1999 ; Levy et coll., 2001). En outre, la mesure des champs de potentiels locaux à partir des électrodes de stimulation à haute fréquence implantées dans le cerveau de patients parkinsoniens a révélé l'existence de synchronisations et d'activités électriques oscillatoires dans le GPi et le NST. Chez le patient parkinsonien non traité, il a ainsi été mis en évidence des oscillations des champs de potentiels locaux à des fréquences de l'ordre de 13 à 30 Hz (Brown & Williams, 2005) alors que les patients dyskinétiques présentent une augmentation de l'amplitude des oscillations pour des fréquences inférieures à 10 Hz (Foffani et coll., 2005 ; Alonso-Frech et coll., 2006). Les implications pathophysiologiques des activités oscillatoires à basse fréquence sont encore inconnues, mais il semble que la stimulation du NST à basse fréquence (5 Hz) soit capable d'induire chez le patient parkinsonien des mouvements choréiformes au niveau du membre supérieur opposé (Liu et coll., 2002). Ces résultats électrophysiologiques

ont conduit certains auteurs à proposer un schéma d'organisation fonctionnelle alternatif dans lequel les troubles moteurs caractéristiques de la maladie de Parkinson ne résulteraient pas uniquement d'une modification du taux de décharge des neurones mais d'une combinaison de caractéristiques physiologiques incluant le taux de décharge, le mode de décharge, le degré de synchronisation et la capacité de réaction somato-sensorielle (*pour revue* : Walter et coll., 2005 ; Figure 22).

1.3.2.2 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

Idéalement, les modèles animaux de la maladie de Parkinson devraient reproduire les mécanismes à l'origine du processus dégénératif associé à cette pathologie ainsi que ses symptômes cliniques et anatomopathologiques. Ces modèles constituent un important support expérimental pour la compréhension des fonctions normales et pathologiques des ganglions de la base et pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Expérimentalement, il existe différents modèles animaux de la maladie de Parkinson, incluant notamment des modèles génétiques au développement prometteur. Néanmoins, les deux principaux modèles utilisés dans l'étude des dyskinésies induites par la L-DOPA chez le sujet parkinsonien sont le modèle du « singe MPTP » et celui du « rat 6-OHDA ».

Le modèle du « singe MPTP »

La 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydro-pyridine (MPTP) fut découverte par hasard, en 1976, par un étudiant en chimie essayant de produire de la 1-méthyl-4-phényl-4-propionoxy-pipéridine (MPPP), un opioïde synthétique. Quelques années plus tard, le MPTP contamina accidentellement les doses de drogue consommées par de jeunes utilisateurs, chez lesquels il provoqua un syndrome parkinsonien typique (Langston et coll., 1983). Le MPTP est une

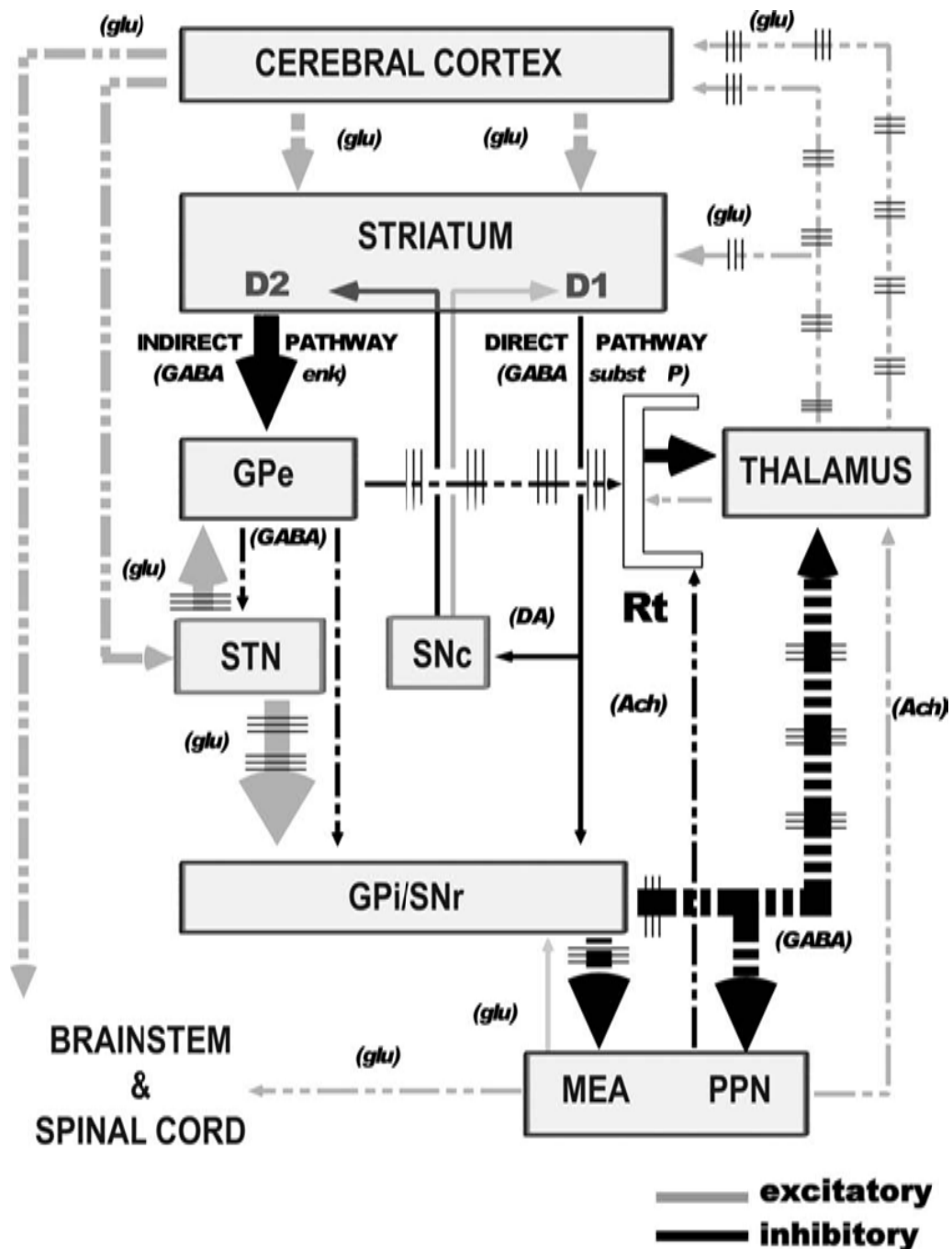


Figure 22 : Représentation schématique du modèle anatomo-fonctionnel alternatif.

Ce schéma, représentant le circuit moteur des ganglions de la base, prend à la fois en compte les caractéristiques anatomiques « classiques », les modifications affectant l'activité électrophysiologique des neurones et les voies anatomiques alternatives impliquant le globus pallidus externe (GPe) et le noyau pédonculopontin (PPN). Les flèches interrompues illustrent une modification du profil électrophysiologique des neurones. Les lignes regroupées perpendiculaires aux projections originaires du noyau sous-thalamique (STN), du globus pallidus interne (GPi) et du thalamus représentent une activité électrique caractérisée par la présence de bouffées de potentiels. *Abréviations*: SNc, substance nigra pars compacta; SNr, substance nigra pars reticulata; D1, D2, récepteurs dopaminergiques de type D1 et D2; Rt, noyau réticulé du thalamus; GABA, acide γ -aminobutyrique; MEA, aire extrapyramidale du mésencéphale; glu, glutamate; enk, enképhalines; subst P, substance P; DA, dopamine; Ach, acétylcholine (d'après *Walter et coll., 2005*).

substance très lipophile capable de franchir rapidement la barrière hémato-encéphalique et d'être métabolisée en ion MPP⁺ (1-méthyl-4-phénylpyridinium) dans les cellules gliales grâce à l'activité enzymatique de la MAO-B. L'ion MPP⁺ peut ensuite être concentré dans les neurones catécholaminergiques via les transporteurs dopaminergiques ou noradrénergiques de la membrane plasmique. À l'intérieur des neurones, il induit la production de radicaux libres qui provoquent des dysfonctionnements du métabolisme mitochondrial (inhibition du complexe I, découplage de la phosphorylation oxydative, altération du potentiel de membrane) avec pour résultante une diminution de la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) et, à terme, la mort cellulaire (Figure 23A). La diminution d'ATP, suite au dysfonctionnement mitochondrial, est également responsable d'une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, qui accélère le processus de dégénérescence (*pour revue* : Blum et coll., 2001). La toxicité dopaminergique du MPTP est utilisée chez de nombreuses espèces animales. Cependant, en raison de leur grande capacité à séquestrer ce composé au niveau vésiculaire (Sundstrom & Samuelsson, 1997), les rongeurs y sont nettement moins sensibles que les primates, la quantité nécessaire pour intoxiquer une souris étant par exemple 30 fois supérieure à celle toxique chez le Singe. Le MPTP est, en outre, dépourvu d'effet toxique quand il est injecté par voie systémique chez le Rat, en raison d'une particularité biochimique de la barrière hémato-encéphalique propre à cette espèce. Chez le Rat, les MAO-B sont en effet exprimées en grande quantité au niveau des vaisseaux sanguins périphériques et l'ion MPP⁺ ainsi formé dans le compartiment périphérique est alors incapable de franchir la barrière hémato-encéphalique. La solution pour s'affranchir de ce problème consiste à administrer directement le MPP⁺ au niveau du tissu cible, par voie stéréotaxique.

Les singes traités par le MPTP développent une akinésie, une rigidité musculaire et une sévère instabilité posturale caractéristiques de la maladie de Parkinson. Les analyses *post mortem* effectuées chez ces animaux révèlent une diminution dramatique des concentrations

striatales de dopamine, qui résulte d'une dégénérescence sélective des cellules dopaminergiques de la substance noire, les neurones dopaminergiques des autres structures étant relativement épargnés (*pour revue* : Blum et coll., 2001). D'un point de vue comportemental, ce modèle produit un large répertoire de déficits moteurs qui reproduisent fidèlement le syndrome parkinsonien humain. En outre, l'administration chronique de L-DOPA chez des singes lésés au MPTP provoque l'apparition de mouvements choréiques et dystoniques qui ressemblent étroitement aux dyskinésies de pic de dose observées chez les patients parkinsoniens (*pour revue* : Lane & Dunnett, 2007). De plus, des phénomènes de « wearing off » et des phénomènes « on/off » ont également été rapportés (Clarke et coll., 1987 ; Kuoppamaki et coll., 2002). Par ailleurs, les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le « singe MPTP » peuvent être évaluées grâce à des échelles de mesure utilisées en clinique après quelques adaptations mineures (Imbert et coll., 2000). Ce modèle présente, en revanche, certaines limites. Tout d'abord, il n'est pas bien standardisé puisque la sévérité et la nature des déficits comportementaux semblent dépendre à la fois des doses de l'agent toxique utilisées et de son mode d'administration. D'autre part, la susceptibilité des animaux est relativement variable suivant l'espèce de primates utilisée. De même, ce modèle ne reproduit pas l'évolution lente de la maladie chez l'Homme. Enfin, certains auteurs ont suggéré qu'il pourrait manquer de stabilité, certains animaux présentant à long terme une récupération motrice spontanée (*pour revue* : Lane & Dunnett, 2007).

Le modèle du « rat 6-OHDA »

L'hydroxy-6-dopamine (6-OHDA) est un composé neurotoxique, dérivé de la dopamine, qui induit la dégénérescence des neurones catécholaminergiques et qui constitue, chez le rongeur, le principal modèle expérimental de la maladie de Parkinson (Ungerstedt, 1971a ; Schwarting

& Huston, 1996 ; Deumens et coll., 2002). Ce composé ne passe pas la barrière hémato-encéphalique et doit, par conséquent, être injecté *in situ*. De par sa structure très proche de celle de la dopamine et de la noradrénaline, la 6-OHDA peut être spécifiquement captée dans les neurones via les transporteurs catécholaminergiques de la membrane plasmique. Une fois dans le cytosol, la dégénérescence des terminaisons et corps cellulaires des neurones catécholaminergiques semble principalement résulter d'une inhibition de l'activité mitochondriale, comme le suggèrent des données indiquant que la 6-OHDA inhibe *in vitro* les chaînes I et IV du complexe mitochondrial (*pour revue* : Blum et coll., 2001). Il en résulte une diminution de la production intra-cellulaire d'ATP, qui conduit à la mort cellulaire. Des études *in vivo* indiquent que la 6-OHDA provoque une forte augmentation de la production de radicaux libres oxygénés (*pour revue* : Gerlach & Riederer, 1996). L'origine de ces radicaux est multiple. D'une part, bien que ce mécanisme soit controversé, le peroxyde d'hydrogène, lui-même producteur d'ions hydroxyles extrêmement réactifs, pourrait être produit à partir de la 6-OHDA grâce à l'activité de la monoamine-oxydase (*pour revue* : Blum et coll., 2001). D'autre part, de nombreux radicaux libres et composés quinoniques pourraient être formés à partir de la 6-OHDA selon un mécanisme d'auto-oxydation non enzymatique. Dans tous les cas, il apparaît que la production de radicaux libres induite par la 6-OHDA est amplifiée en présence de fer (Figure 23B). D'un point de vue pratique, la toxine peut-être administrée par voie intracérébroventriculaire (*i.c.v.*) et, dans ce cas, elle est généralement précédée par l'injection d'une molécule protégeant les neurones noradrénergiques et adrénérgiques, comme la désipramine, un inhibiteur de la capture neuronale de ces neurotransmetteurs. Néanmoins, le mode d'administration le plus courant s'effectue par voie intra-parenchymateuse grâce à une injection directe dans la substance noire pars compacta (SNc), le striatum ou le faisceau médian du télencéphale (MFB). La sévérité de la lésion, qui correspond au nombre de neurones dopaminergiques détruits, dépend fortement du site d'injection de la toxine. Les

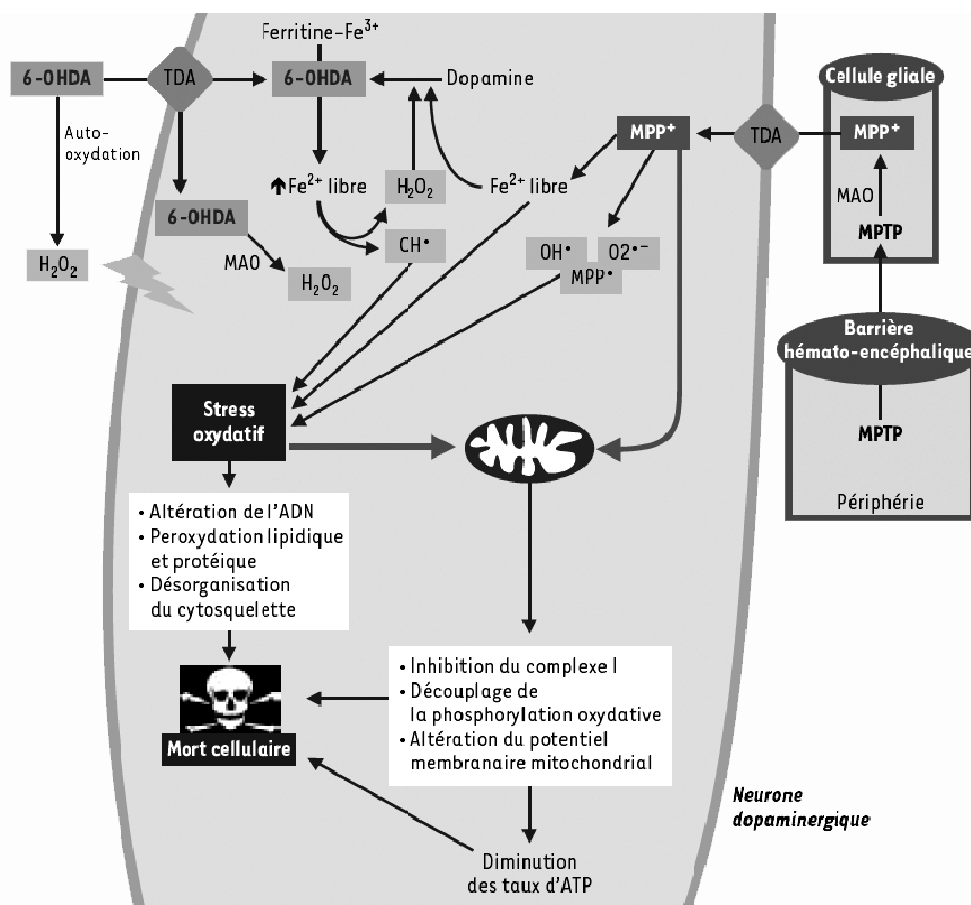


Figure 23 : Représentation schématique des mécanismes d'actions du MPTP et de la 6-OHDA.

L'accumulation de 6-OHDA dans les neurones dopaminergiques conduit à : (1) des modifications mitochondriales (inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, découplage de la chaîne de phosphorylation oxydative et diminution du potentiel membranaire mitochondrial [$\Delta\psi_m$]), qui concourent à la diminution des taux d'ATP ; (2) la formation d'espèces radicalaires très réactives qui endommagent les macromolécules et participent à la désorganisation de la structure cellulaire. Ces événements conjugués conduisent à la mort des neurones. Une oxydation de la 6-OHDA peut également avoir lieu à l'extérieur de la cellule et contribue à l'accroissement des taux de radicaux libres intracellulaires. Le MPTP est, quant à lui, transformé en son métabolite actif, le MPP⁺, par la monoamine oxydase de type B présente dans les cellules gliales. Relargué par ces dernières, il est alors capté par les neurones dopaminergiques où il va, comme la 6-OHDA, inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, augmenter la synthèse de radicaux libres et provoquer la mort cellulaire. La diminution des taux d'ATP, résultant du dysfonctionnement mitochondrial, est également responsable d'une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, qui accélère le processus de dégénérescence (d'après *Lambeng et coll., 2002*).

injections au niveau du MFB produisent les lésions les plus sévères vis-à-vis du nombre de neurones nigro-striataux et des concentrations striatales de dopamine, tandis que les injections dans la SNc ou le striatum ont été respectivement décrites comme reflétant plus fidèlement l'évolution de la pathologie humaine et présentant une meilleure sélectivité (Deumens et coll., 2002). Néanmoins, les injections dans le MFB semblent plus adaptées au modèle

expérimental des dyskinésies induites par la L-DOPA, qui requiert une dégénérescence massive des neurones dopaminergiques (Winkler et coll., 2002). Outre les différences liées au site d'injection, les lésions par injection de neurotoxine peuvent aussi diverger en fonction du mode d'administration unilatéral ou bilatéral. Les lésions bilatérales présentent l'avantage de reproduire au mieux la dégénérescence observée chez les patients parkinsoniens dans les stades les plus avancés de la maladie. De plus, elles préviennent la survenue de mécanismes compensatoires, potentiellement induits par le côté restant intact dans le modèle unilatéral. Cependant, les lésions bilatérales sont moins utilisées car elles entraînent une aphagie (forme extrême de dysphagie caractérisée par l'impossibilité de déglutir et donc d'avalier de la nourriture) et une adipsie (diminution ou perte totale de la soif) sévères et génèrent, par conséquent, un taux de mortalité élevé (Ungerstedt, 1971b). De plus, elles n'induisent pas d'asymétrie comportementale et ne permettent donc pas d'évaluer l'efficacité de la lésion par des tests comportementaux de rotations induites pharmacologiquement.

D'un point de vue comportemental, les études initiales menées chez le Rat après déafférentation nigro-striatale par la 6-OHDA ont principalement concerné les rotations induites pharmacologiquement. Selon le modèle décrit par Ungerstedt, l'administration d'un agoniste dopaminergique tel que l'apomorphine (agoniste non sélectif des récepteurs dopaminergiques D₁ à D₅) à un animal ayant subi une lésion unilatérale par la 6-OHDA provoque des rotations dans la direction opposée au côté de la lésion. L'apparition de ce comportement résulte du développement d'une hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques postsynaptiques (essentiellement D₂) au niveau du striatum ipsilatéral à la lésion (Ungerstedt, 1971a). À l'inverse, l'injection d'amphétamine, qui suscite la libération de dopamine à partir des terminaisons nerveuses et inhibe sa recapture, produit une stimulation supérieure du côté intact où le nombre de terminaisons dopaminergiques est le plus important. Dans ce cas, les animaux présentent des rotations dirigées dans le sens ipsilatéral au côté lésé.

Ces deux composés permettent ainsi d'évaluer l'intensité de la lésion induite par l'injection de 6-OHDA dans le MFB (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970). En accord avec cette hypothèse, il a été montré que l'administration de L-DOPA, précurseur de la dopamine, provoque, comme les agonistes dopaminergiques directs, de nombreuses rotations contralatérales (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970 ; Ungerstedt, 1976 ; Reavill et coll., 1983). Certains auteurs ont d'ailleurs suggéré que ces rotations pourraient en fait constituer la principale manifestation motrice du traitement par la L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien, les autres mouvements involontaires observés chez cette espèce (mastications, mouvements saccadés de la patte antérieure, torsions dystoniques du tronc et de la tête) correspondant alors à l'expression de mécanismes compensatoires et/ou d'adaptations posturales résultant de ces rotations (Nutt, 1990 ; Chase, 1998 ; Brotchie & Fox, 1999 ; Langston et coll., 2000). Cependant, aucune corrélation entre les rotations contralatérales induites par la L-DOPA et les autres types de mouvements dyskinétiques n'a été démontrée. De plus, l'administration de bromocriptine, agoniste direct des récepteurs D₂ n'induisant pas *de novo* de dyskinésies, provoque de nombreuses rotations contralatérales en absence de mouvements involontaires et anormaux (Lundblad et coll., 2002). En outre, une déafférentation dopaminergique restreinte au striatum latéral permet, en réponse au traitement par la L-DOPA, le développement de mouvements anormaux au niveau de la patte et du système oro-lingual, mais ne suscite pas de rotations contralatérales (Winkler et coll., 2002). Par ailleurs, l'administration chronique de L-DOPA à des animaux ayant subi une lésion nigro-striatale bilatérale, et ne pouvant donc pas exprimer de comportement rotatoire, permet néanmoins l'apparition de mouvements involontaires et anormaux (Schallert et coll., 1979). Certains auteurs ont suggéré que les mouvements anormaux exprimés chez le Rat traité par la L-DOPA et les manifestations choréiformes observées chez l'Homme ne seraient pas équivalentes, ce qui va à l'encontre du modèle des dyskinésies induites expérimentalement par la L-DOPA chez cette espèce (Chase, 1998 ; Langston et coll., 2000 ;

Bezard et coll., 2001). Si l'on se réfère à la définition de la symptomatologie humaine généralement énoncée dans les manuels, les mouvements anormaux exprimés chez le Rat semblent s'inscrire dans le registre des stéréotypies motrices (mouvements répétitifs dépourvus de finalité) plutôt que dans celui des mouvements de type choréique (mouvements aléatoires ressemblant à ceux de la danse et caractérisés par de brèves contractions musculaires). Cependant, dans le contexte du répertoire comportemental exprimé chez le Rat, les mouvements anormaux induits par la L-DOPA sont clairement différents des stéréotypies classiquement associées à une transmission dopaminergique excessive (Creese & Iversen, 1973 ; Andersson et coll., 2001). Ces dernières correspondent, en effet, à une répétition pathologique d'activités motrices normales (reniflements, lèchements, rongements et hochements de la tête) alors que les mouvements dyskinétiques provoqués par la L-DOPA s'apparentent à des programmes moteurs fragmentés et altérés perturbant les activités comportementales normales (*pour revue* : Winkler et coll., 2002). Bien que cette notion ait été contestée, il semble désormais admis que les mouvements involontaires induits progressivement par l'administration réitérée de L-DOPA, chez le Rat unilatéralement lésé à la 6-OHDA, constituent un équivalent comportemental des dyskinésies de pic de dose observées chez le patient parkinsonien (*pour revue* : Lane & Dunnett, 2007).

Le modèle du rat 6-OHDA présente divers avantages. Il y a d'abord ceux liés à l'espèce : faibles coûts d'entretien et, contrairement au Singe, faible variabilité interindividuelle au sein d'une même souche. En outre, l'anatomie et le fonctionnement de son système dopaminergique méso-striatal sont largement documentés. Quoique non exclusive, la toxicité de la 6-OHDA vis-à-vis du système dopaminergique est, de plus, relativement sélective. En outre, la réalisation de la lésion est assez aisée, permettant, une fois maîtrisée, l'obtention de résultats reproductibles. Néanmoins, ce modèle présente certains inconvénients au rang desquels figure, en premier lieu, le fait que la déafférentation dopaminergique ne se développe

pas progressivement et que la symptomatologie ne retranscrit pas fidèlement le répertoire comportemental observé chez l'Homme.

1.3.2.3 BASES NEUROCHIMIQUES EXPÉRIMENTALES

L'apparition des dyskinésies, leur sévérité et leur évolution clinique varient intensément. Outre cette disparité, le traitement des dyskinésies est rendu d'autant plus compliqué que de nombreuses hypothèses tentent d'explorer les altérations neurochimiques qui les sous-tendent. La théorie la plus communément admise met en jeu des altérations persistantes induites au niveau des ganglions de la base par la déafférentation nigro-striatale couplée à une stimulation dopaminergique non physiologique. Cependant, de nombreuses études indiquent que les bases neurochimiques des dyskinésies pourraient être bien plus complexes.

1.3.2.3.1 HYPOTHÈSE DOPAMINERGIQUE

Les données cliniques indiquent que le risque de développer des mouvements dyskinétiques est positivement corrélé à la sévérité de la pathologie ainsi qu'à la dose de L-DOPA initialement ou cumulativement administrée (*pour revue* : Schrag & Quinn, 2000). En effet, les fluctuations motrices et dyskinésies induites par la L-DOPA apparaissent étroitement liées à ses propriétés pharmacocinétiques, caractérisées par une demi-vie plasmatique relativement courte (de 60 à 90 min). Ainsi, dans les premiers stades de la maladie, les neurones dopaminergiques survivants sont capables d'assurer l'amortissement de cette cinétique grâce à leur capacité de stockage et de sécrétion endogène de dopamine. L'effet de la L-DOPA reste alors stable sur une période de temps relativement longue. En revanche, lorsque la déafférentation dopaminergique devient majeure, le traitement par la L-DOPA ne permet plus d'assurer une stimulation dopaminergique stable, laquelle fluctue dès lors au gré de la

concentration plasmatique de L-DOPA. Cette restauration pharmacologique de l'activité dopaminergique, caractérisée par des phases d'augmentation et de déclin non physiologiques, est généralement considérée comme essentielle dans le développement des mouvements dyskinétiques (Chase, 1998). C'est, en effet, de manière concomitante à cette instabilité dopaminergique qu'apparaissent généralement les fluctuations motrices et les troubles dyskinétiques. Les troubles moteurs surviendraient ainsi essentiellement au moment où la concentration plasmatique de L-DOPA est la plus forte (dyskinésies de pic de dose) ou la plus faible (phénomènes « off »). Les données cliniques, étayées par de nombreux résultats expérimentaux obtenus chez l'animal (*pour revue* : Cenci, 2007), ont ainsi contribué à faire émerger l'hypothèse que les dyskinésies induites par la L-DOPA pourraient résulter d'altérations durablement provoquées au niveau des ganglions de la base par la simultanéité de la dénervation dopaminergique et de la stimulation intermittente des récepteurs dopaminergiques.

La théorie dopaminergique associée aux dyskinésies induites par la L-DOPA pose en fait la question de savoir si les effets secondaires provoqués par la thérapie anti-parkinsonienne peuvent être ou non contrôlés par une simple adaptation pharmacologique au niveau des récepteurs dopaminergiques. Les récepteurs dopaminergiques ont ainsi été intensément étudiés dans le contexte de la maladie de Parkinson, tout comme dans les dyskinésies induites par la L-DOPA, où un mécanisme d'hypersensibilité est généralement évoqué. Les récepteurs dopaminergiques sont regroupés en deux familles distinctes, la sous-famille D₁ (regroupant les types D₁ et D₅) et la sous-famille D₂ (types D₂, D₃ et D₄), qui se différencient par leurs propriétés biochimiques et pharmacologiques. Schématiquement, dans le striatum, les récepteurs de type D₁ sont préférentiellement exprimés par les neurones de la voie directe (en direction du GPi de la SNr) alors que ceux de type D₂ sont principalement exprimés par les neurones de la voie indirecte (vers le GPe). Les études cliniques montrent que le traitement

d'emblée de patients parkinsoniens par des agonistes directs du récepteur D₂ retarde l'apparition des dyskinésies par comparaison au traitement inaugural par la L-DOPA (Rascol et coll., 2000). Il apparaît, en outre, que le traitement par la L-DOPA normalise l'augmentation striatale des taux d'ARNm codant le récepteur D₂, qui résulte de la dénervation dopaminergique (Morissette et coll., 1996), ainsi que la synthèse de ce récepteur (Lee et coll., 1978 ; Calon et coll., 2000). En revanche, l'expression des récepteurs D₁ ne semble pas être modifiée chez les patients parkinsoniens, tout comme dans les modèles expérimentaux. Une éventuelle hypersensibilité des récepteurs D₁ pourrait néanmoins être due à une augmentation de leur couplage avec l'adénylyl cyclase. En effet, les taux de sous-unités α des protéines G_s et G_{olf} (son isoforme olfactive) sont augmentés dans le striatum de rats dénervés par la 6-OHDA, ainsi que dans celui de patients parkinsoniens (Herve et coll., 1993 ; Marcotte et coll., 1994 ; Corvol et coll., 2004). Ces données ont par ailleurs un sens fonctionnel puisque G_{olf} est localisée au niveau de la membrane des neurones et que, chez le Rat, elle est associée à une augmentation de réponse de l'adénylyl cyclase (Corvol et coll., 2004). Il a, de plus, été récemment montré, chez le Singe, que l'augmentation du couplage des récepteurs D₁ est corrélée à la présence des dyskinésies, suggérant que l'hypersensibilité des récepteurs D₁ pourrait jouer un rôle dans leur apparition (Aubert et coll., 2005). Enfin, les récepteurs de type D₃ ont été également impliqués dans la pathogenèse des dyskinésies puisque leur expression dans le striatum, structure dont ils sont exclus dans les conditions normales, semble coïncider avec le développement de ces troubles moteurs (Bordet et coll., 1997 ; Guigoni et coll., 2005).

1.3.2.3.2 HYPOTHÈSE GLUTAMATERGIQUE

Le glutamate représente le principal neurotransmetteur excitateur des ganglions de la base. En effet, le striatum est massivement innervé par des projections glutamatergiques principalement originaires du cortex et, à moindre degré, du thalamus. Par ailleurs, le NST reçoit également des afférences glutamatergiques d'origine corticale. De plus, tous les sous-types de récepteurs glutamatergiques sont exprimés au niveau des terminaisons dopaminergiques. Compte tenu de l'organisation anatomo-fonctionnelle des circuits cérébraux contrôlant le mouvement, il n'est donc pas surprenant que les substances altérant sélectivement la transmission glutamatergique centrale puissent profondément influencer les fonctions motrices (Starr, 1995). Bien que tous les récepteurs glutamatergiques puissent probablement contribuer à l'expression des dyskinésies induites par la L-DOPA, les données actuellement disponibles concernent principalement les récepteurs ionotropiques de type NMDA, dont l'expression est augmentée chez le patient parkinsonien et chez le « singe MPTP » traité par la L-DOPA (Ulas et coll., 1994 ; Calon et coll., 2002b). Chez le « primate MPTP » dyskinétique, il a été montré, au niveau striatal, que cette expression accrue des récepteurs NMDA est associée à une augmentation du nombre des sous-unités NR2A et NR2B (Calon et coll., 2002b). Chez le Rat, il a été mis en évidence que la lésion unilatérale par la 6-OHDA diminue l'expression striatale des sous-unités NR1 et NR2B (Dunah et coll., 2000), augmentant ainsi la proportion relative des sous-unités NR2A. Le traitement chronique de ces animaux par la L-DOPA restaure l'expression des sous-unités NR1 et NR2B à leur niveau de base, mais induit en revanche une hyperphosphorylation des sous-unités NR2A et NR2B (Oh et coll., 1998 ; Dunah et coll., 2000). Chez le Rat, les sous-unités NR2A striatales sont réparties de manière ubiquiste au niveau des neurones des voies directe, indirecte et des interneurones, hormis les interneurones cholinergiques (Standaert et coll., 1999). En revanche, chez l'Homme, la sous-unité NR2A est exprimée de manière prédominante au

niveau des neurones striato-pallidaux de la voie directe et des interneurons GABAergiques (Kuppenbender et coll., 2000). Malgré les différences interspécifiques qu'elles révèlent, ces études sont intéressantes car elles suggèrent que l'expression des dyskinésies induites par la L-DOPA pourrait être liée à une expression différentielle des sous-unités du récepteur NMDA et/ou à son état de phosphorylation. L'état de phosphorylation des sous-unités du récepteur NMDA peut moduler la probabilité d'ouverture du canal ionique et affecter sa distribution cellulaire ainsi que son ancrage dans la membrane plasmique. En ce qui concerne les études comportementales, celles-ci indiquent que, chez le rat hémi-parkinsonien, l'administration systémique de MK801, un antagoniste sélectif des récepteurs glutamatergiques de type NMDA, permet de prévenir et d'abolir les complications motrices résultant du traitement chronique par la L-DOPA (Marin et coll., 1996). Chez le primate, le rémacémide (un autre antagoniste de ces récepteurs) améliore également les dyskinésies induites par la L-DOPA (Papa & Chase, 1996). Ces effets semblent résulter d'un blocage de la transmission assurée par les récepteurs NMDA du striatum (Papa et coll., 1995). L'inhibition d'une activité glutamatergique striatale excessive est, par ailleurs, généralement évoquée pour rendre compte de la capacité de l'amantadine (Mantadix[®]) à réduire, de manière efficace et inégalée, les dyskinésies induites par la L-DOPA en clinique humaine (Blanchet et coll., 1998 ; Rajput et coll., 1998 ; Del Dotto et coll., 2001). Un nombre croissant d'études indique que les récepteurs ionotropiques de type AMPA pourraient être également impliqués dans les dyskinésies (*pour revues* : Brotchie et coll., 2005 ; Deogaonkar & Subramanian, 2005). Enfin, il a récemment été mis en évidence une augmentation de l'expression de la protéine Homer-1a, qui interagit avec les récepteurs métabotropiques du glutamate, corrélée avec l'intensité des dyskinésies (Sgambato-Faure et coll., 2005).

Une meilleure compréhension des mécanismes qui conduisent à une activation excessive de la transmission glutamatergique dans les phénomènes dyskinétiques et des processus qui

pourraient induire sa normalisation permettra probablement le développement de stratégies thérapeutiques plus efficaces que l'amantadine dans le traitement des effets secondaires induits par la L-DOPA chez le patient parkinsonien.

1.3.2.3.3 AUTRES HYPOTHÈSES

Diverses autres hypothèses neurochimiques ont également été évoquées. Elles mettent par exemple en jeu les systèmes GABAergique, noradrénergique, adénosinergique, peptidergique ou encore des facteurs de transcription de la famille Fos.

Bien que les récepteurs GABA ne soient pas directement impliqués dans la maladie de Parkinson, ils pourraient contribuer au développement des dyskinésies. Il a, en effet, été mis en évidence chez le « singe MPTP » que le développement des dyskinésies est associé à une augmentation de l'expression des récepteurs GABAergiques au niveau du GPi, qui n'est pas observée chez les animaux non dyskinétiques. Ces données ont été confirmées *post mortem* dans le GPi de patients parkinsoniens dyskinétiques chez lesquels l'expression des récepteurs GABA_A est augmentée (*pour revues* : Brotchie et coll., 2005 ; Deogaonkar & Subramanian, 2005).

Lors de la maladie de Parkinson idiopathique, ou lors d'une exposition au MPTP, le système noradrénergique est également atteint. Ainsi, une baisse significative du taux de noradrénaline a été mise en évidence dans le cortex et le striatum du « singe MPTP » ainsi que chez le patient parkinsonien (*pour revue* : Deogaonkar & Subramanian, 2005)). Les effets de la noradrénaline sont assurés par les récepteurs α (α_1 et α_2) et β (β_1 et β_2). La distribution de ces récepteurs dans le système nerveux central est hétérogène. Au niveau des ganglions de la base, l'expression des récepteurs α_2 (α_{2A} , α_{2B} et α_{2C}) prédomine. Chez le « singe MPTP », l'administration de yohimbine (antagoniste α_2) s'est avérée capable de réduire les dyskinésies

induites par la L-DOPA (Gomez-Mancilla & Bedard, 1993). Chez l'Homme, le propranolol, un β -bloquant, réduit également les dyskinésies induites par la L-DOPA (Carpentier et coll., 1996).

Les récepteurs A_{2a} de l'adénosine ont récemment retenu une grande attention en raison de leur interaction avec le système dopaminergique, les plaçant au rang de cible potentielle dans le traitement de la maladie de Parkinson. Ces récepteurs sont couplés aux protéines G_i . Ils sont localisés dans diverses structures des ganglions de la base et participent au contrôle du mouvement. Chez le patient parkinsonien et chez le « rat 6-OHDA », les dyskinésies induites par la L-DOPA sont associées à une augmentation des niveaux d'expression de ces récepteurs (*pour revues* : Brotchie et coll., 2005 ; Deogaonkar & Subramanian, 2005). De manière intéressante, Calon et coll. (2004) ont indiqué que la quantité d'ARNm codant ce récepteur est augmentée dans le putamen de patients parkinsoniens dyskinétiques et que le taux de liaison au récepteur est quant à lui augmenté dans le GPe. Ces résultats suggèrent que les dyskinésies induites par la L-DOPA pourraient être associées à une augmentation de l'expression des récepteurs A_{2a} de la voie striato-pallidale indirecte. Chez le Singe et le rongeur, il a été montré que le KW6002, un antagoniste sélectif des récepteurs A_{2a} , améliore certains symptômes parkinsoniens, sans induire le développement de dyskinésies, ni exacerber l'expression de dyskinésies préexistantes (*pour revue* : Kase et coll., 2003).

Des neuropeptides tels la dynorphine, les enképhalines et la substance P peuvent également jouer un rôle important au niveau des voies striatales efférentes. Cependant, leur implication dans la maladie de Parkinson et dans le développement des dyskinésies induites par la L-DOPA est controversée. Bien que les études initiales aient indiqué une diminution de l'expression striatale de ces neuropeptides chez des animaux présentant un comportement hyperlocomoteur (Xu et coll., 1994), ainsi que chez les patients parkinsoniens (Fernandez et coll., 1996 ; de Ceballos et coll., 1999), une augmentation des concentrations de ces

neuropeptides a été observée dans le striatum de rats dyskinétiques (Cenci et coll., 1998 ; Fritschi et coll., 2003), selon un mécanisme qui pourrait résulter d'une augmentation de l'expression striatale de FosB (Andersson et coll., 1999 ; Cenci, 2002). Henri & Brotchie (1996) ont également suggéré une augmentation de la synthèse des enképhalines et des dynorphines au niveau des neurones innervant le pallidum dans les modèles d'animaux parkinsoniens rendus dyskinétiques par administration chronique de L-DOPA ou d'apomorphine. En revanche, l'administration de bromocriptine, agoniste des récepteurs dopaminergiques D₂ qui induit moins de dyskinésies chez l'Homme, ne modifie pas l'expression de ces neuropeptides. Par ailleurs, Piccini et coll. (1997) ont rapporté une hyperactivité du système opioïde striatal chez des parkinsoniens dyskinétiques traités par la L-DOPA. Une élévation des taux d'enképhalines chez les patients parkinsoniens dyskinétiques et non dyskinétiques a de plus été mise en évidence *post mortem* (Calon et coll., 2002a).

L'expression des antigènes de la famille Fos est induite dans de nombreuses régions cérébrales en réponse à une stimulation neuronale chronique. Différentes isoformes de ces antigènes peuvent, en outre, être produites par différents stimuli. Ces isoformes sont spécifiques du gène cible et sont apparentées au degré d'expression de gènes précoces immédiats. Chez les rats parkinsoniens, il a été montré une induction de Δ FosB et de ses isoformes (Vallone et coll., 1997). Les antigènes Fos forment des dimères appelés complexes AP-1 qui peuvent interagir avec les gènes rapporteurs du même nom. Les gènes rapporteurs AP-1 régulent l'expression de nombreuses protéines dont les neurotransmetteurs et neuropeptides, ainsi que certains de leurs récepteurs (notamment les récepteurs NMDA et les récepteurs dopaminergiques). Ces modulations pourraient induire des modifications dans les neurones GABAergiques et glutamatergiques, avec comme conséquence l'apparition de réponses motrices anormales telles que les dyskinésies induites par la L-DOPA (Calon et coll., 2000).

2. BUT DU TRAVAIL

Le striatum, structure cérébrale la plus volumineuse chez les mammifères, est considéré comme le principal composant des circuits neuronaux orchestrant les comportements psychomoteurs. D'un point de vue anatomique, il est massivement innervé par des afférences originaires du cortex cérébral et de la pars compacta de la substance noire (SNc), qui utilisent respectivement le glutamate et la dopamine comme neurotransmetteurs. Le striatum contient aussi de nombreux neuropeptides, au premier rang desquels les enképhalines, ligands endogènes préférentiels des récepteurs opioïdes de type δ . Aucun contact synaptique direct n'a été observé entre les terminaisons nigro-striatales et cortico-striatales. Néanmoins, la stimulation exercée de manière présynaptique par le glutamate sur la libération de dopamine (Giorgiueff-Chesselet et coll., 1979 ; Westerink et coll., 1989b ; Wang, 1991 ; Desce et coll., 1992) et l'inhibition induite en retour par la dopamine sur la libération de glutamate (Brown & Arbuthnott, 1983 ; Godukhin et coll., 1984 ; Maura et coll., 1988 ; Yamamoto & Davy, 1992) sont largement documentées. En ce qui concerne les modulations induites par les récepteurs opioïdes de type δ , de nombreuses études ont mis en évidence que leur stimulation accroît la libération striatale de dopamine (Chesselet et coll., 1981 ; Dourmap et coll., 1990 ; Spanagel et coll., 1990). Des expériences, précédemment menées dans notre laboratoire, indiquent par ailleurs que cet effet est aboli par le 3-[(\pm)-2-carboxypiperazine-4-yl]-propionyl-1-phosphonate (CPP), un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type NMDA. Ce résultat suggère l'implication des neurones glutamatergiques dans la libération de dopamine induite par les récepteurs opioïdes de type δ . Néanmoins, il existe très peu de données se rapportant aux effets induits par les récepteurs opioïdes de type δ sur les taux extracellulaires de glutamate dans le striatum. Arneric et coll. (1986) ont indiqué que la Met-enképhaline augmente la libération de glutamate à partir de coupes striatales, mais cette enképhaline endogène n'est pas strictement sélective des récepteurs opioïdes δ puisqu'elle se lie également aux récepteurs de type μ avec, cependant, une plus faible affinité (Hollt, 1986 ;

Meucci & coll., 1989 ; Mansour et coll., 1995). Plus récemment, Rawls & McGinty (2000) ont également suggéré une interaction entre ces deux systèmes en montrant que le naltrindole, un antagoniste des récepteurs δ , diminue la libération striatale de glutamate évoquée par l'amphétamine. Cette libération de glutamate induite par l'amphétamine n'a cependant pas été observée dans d'autres études de microdialyse (Nash & Yamamoto, 1993 ; Reid et coll., 1997). En ce qui concerne l'expression striatale des récepteurs δ , les études autoradiographiques indiquent que ces récepteurs et leurs ARNm sont principalement représentés au niveau des interneurons cholinergiques (Le Moine et coll., 1994 ; Mansour et coll., 1994). Plus récemment, Wang & Pickel (2001) ont cependant suggéré qu'une partie de ces récepteurs pourrait être localisée sur les terminaisons des neurones nigro-striataux et cortico-striataux. Bien que ces mêmes auteurs aient indiqué qu'elle semble très faible *in vivo*, plusieurs études ont également mis en évidence une expression des récepteurs opioïdes de type δ au niveau des cellules gliales, dans diverses structures (Lightman et coll., 1983 ; Eriksson et coll., 1990) dont le striatum (Ruzicka et coll., 1995). Les données laissant envisager une expression potentielle des récepteurs δ au niveau des terminaisons cortico-striatales et des cellules gliales, qui entretiennent avec les premières de très étroites relations anatomiques et fonctionnelles, sont particulièrement intéressantes. En effet, conjointement aux effets stimulants exercés sur la libération striatale de dopamine, elles suggèrent que les enképhalines pourraient à la fois moduler les deux principaux systèmes de transmission du striatum. Les interactions entre les transmissions glutamatergique et dopaminergique striatales sont impliquées dans de nombreuses fonctions, principalement motrices (incluant la préparation et le contrôle du mouvement) mais aussi cognitives (mémoire procédurale, attention et mécanismes de récompense). Des dysfonctionnements au niveau de ces interactions glutamate-dopamine ont, en outre, été mis en évidence dans la physiopathologie des principaux troubles moteurs associés au striatum : la chorée de Huntington (Cepeda et

coll., 2007) et la maladie de Parkinson (Starr, 1995 ; Stephens et coll., 2005). De manière intéressante, il a été suggéré que les récepteurs δ pourraient offrir un potentiel thérapeutique dans le traitement de la maladie de Parkinson (Huzdik et coll., 2000) et, notamment en ce qui concerne les dyskinésies induites par la L-DOPA thérapie (Henry et coll., 2001). Une meilleure connaissance des modulations induites par les récepteurs δ sur les systèmes de transmission glutamatergique et dopaminergique striataux s'avère donc importante pour qui cherche à comprendre précisément la physiologie du striatum et à élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de ses dysfonctionnements.

Les travaux que nous avons menés dans ce contexte ont eu pour objectif initial d'explorer, par microdialyse intrastriatale, l'influence des récepteurs opioïdes δ sur la libération de glutamate. Nous avons également étudié les effets de la DPDPE, agoniste sélectif des récepteurs δ , sur les libérations striatales de glutamate et de dopamine chez des animaux ayant préalablement subi une destruction des afférences originaires du cortex ipsilatéral. Nous avons, en outre, évalué l'effet de cette déafférentation cortico-striatale sur la radiolisation de [3 H]-DPDPE à des préparations membranaires obtenues à partir du striatum. Dans une seconde partie, nous avons recherché dans quelle mesure les cellules gliales pourraient participer aux effets résultant de la stimulation des récepteurs δ striataux. Pour ce faire, nous avons étudié l'influence de la DPDPE sur les taux extracellulaires de glutamate et de dopamine dans le striatum ipsilatéral d'animaux ayant subi une inactivation des cellules gliales au moyen d'une gliotoxine, l'acide L- α -aminoadipique (L- α AA). Enfin, nous avons étudié les effets des récepteurs δ par une approche comportementale, grâce au modèle des dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 ANIMAUX

Les expériences sont réalisées sur des rats Sprague-Dawley mâles (250-300 g, Charles River, Saint-Aubin-lès-Elbeuf, France). Les animaux sont maintenus sous un cycle jour-nuit de 12 heures/12 heures, à une température de 22° C, sous ventilation constante et ont libre accès à la consommation d'eau et de nourriture (*ad libitum*). Toutes les expériences sont effectuées selon les recommandations de la Directive du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC). Les techniques de « microdialyse intracérébrale chez le Rat éveillé », de « lésion de structures cérébrales par thermo-coagulation chez le Rat », de « lésion cérébrale produite par injection de neurotoxine ou de gliotoxine chez le Rat » et « d'injection intracérébroventriculaire chez le Rat » ont notamment obtenu l'approbation du Comité Régional d'Éthique (N/03-06-06/06, N/17-04-04-19, N/04-06-07/07 et N/05-04-04/07 respectivement). Enfin, nous nous sommes efforcés de réduire le nombre d'animaux utilisés au cours de nos expériences et de leur assurer les meilleures conditions de bien-être, avant, pendant et après chaque expérimentation.

3.2 CHIRURGIE

3.2.1 LÉSIONS CORTICALES

Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale (*i.p.*) d'une solution d'hydrate de chloral (400 mg/kg) et sont installés sur un cadre stéréotaxique (David Kopf Instruments, CA). Le crâne est ensuite mis à nu et deux trous y sont percés. La lésion unilatérale du cortex frontal droit est réalisée par thermo-coagulation directe du tissu cérébral en deux points (A/P : + 3,4 mm ; M/L : - 3,0 mm ; D/V : - 1,0 mm et A/P : + 0,5 mm ; M/L : - 3,0 mm ; D/V : - 0,8 mm par rapport au bregma et à la dure mère) selon l'atlas stéréotaxique de Paxinos & Watson

(1986). La thermo-coagulation est effectuée au moyen d'une électrode (L = 4 mm ; diamètre = 0.5 mm ; Thermistor Electrode, Radionics, U.S.A.) reliée à un générateur de radiofréquences (RFG-4, Radionics, U.S.A.) calibré de manière à fournir un courant de 15 V pendant 50 s. L'électrode est ensuite lentement ôtée, les trous sont colmatés grâce à de la cire d'abeille naturelle et le champ chirurgical est suturé. Les expériences consécutives débutent deux jours après l'intervention chirurgicale, pour permettre la récupération complète des animaux.

3.2.2 INJECTION INTRA-STRIATALE D'ACIDE L- α -AMINOADIPIQUE

Les animaux sont anesthésiés par injection *i.p.* d'hydrate de chloral (400 mg/kg) puis sont installés sur un cadre stééotaxique (David Kopf Instruments, U.S.A.). La boîte crânienne est mise à nu et un trou y est percé pour permettre l'infusion *in situ* de 5 μ L d'une solution d'acide L- α -aminoadipique (L- α AA, 40 μ g/ μ L) dans le striatum droit (A/P : + 0,5 mm ; M/L : - 3,0 mm ; D/V : - 5,0 mm par rapport à la dure mère et au bregma ; selon Paxinos & Watson, 1986) au débit de 0,5 μ L/min. La canule d'injection est laissée en position 5 minutes après l'injection puis retirée lentement. L'orifice est refermé à l'aide de cire d'abeille naturelle et le champ chirurgical est ensuite suturé. Les animaux sont isolés dans des cages individuelles pendant deux jours, pour permettre leur récupération avant les expériences ultérieures.

3.2.3 INJECTION D'HYDROXY-6-DOPAMINE DANS LE FAISCEAU MÉDIAN DU TÉLENCÉPHALE

Les animaux sont anesthésiés par injection *i.p.* d'une solution d'hydrate de chloral (400 mg/kg) et sont installés sur un cadre stéréotaxique (David Kopf Instruments, CA). La boîte crânienne est mise à nu et un trou y est percé pour permettre l'infusion *in situ* de 4 μ L d'une

solution d'hydroxy-6-dopamine (6-OHDA) à 2 µg/µL, dans 0,2 % d'acide ascorbique, au niveau du faisceau médian du télencéphale (MFB) (A/P : - 3,8 mm ; M/L : - 1,5 mm ; D/V : - 8,5 mm par rapport à la dure mère et au bregma ; selon Paxinos & Watson, 1986), au débit de 0,5 µL/min. La canule d'injection est laissée en position 5 minutes après l'injection puis retirée lentement et l'orifice est refermé à l'aide de cire d'abeille naturelle. Le champ chirurgical est ensuite suturé et les animaux sont répartis dans des cages individuelles au sein de l'animalerie pour permettre leur récupération.

3.2.4 IMPLANTATION D'UNE CANULE-GUIDE POUR LES INJECTIONS INTRACÉRÉBROVENTRICULAIRES

Les animaux sont anesthésiés par injection *i.p.* d'une solution d'hydrate de chloral (400 mg/kg) et sont installés sur un cadre stéréotaxique (David Kopf Instruments, CA). La boîte crânienne est mise à nu et un trou y est percé pour permettre l'implantation de la canule-guide au niveau du ventricule latéral droit (A/P : - 0,8 mm ; M/L : - 1,5 mm ; D/V : - 3,0 mm par rapport à la dure-mère et au bregma ; selon Paxinos & Watson, 1986). La canule est fixée à demeure grâce à deux vis en acier inoxydable et un amalgame réalisé à l'aide de résine acrylique dentaire (Texton, SS White, Angleterre ; Dentsply DeTrey, Angleterre). Le champ opératoire est ensuite suturé et les animaux sont isolés dans des cages individuelles.

3.2.5 IMPLANTATION D'UNE CANULE-GUIDE POUR LES EXPÉRIENCES DE MICRODIALYSE

Les animaux, sous anesthésie générale (hydrate de chloral, 400 mg/kg), sont placés sur un cadre stéréotaxique (David Kopf Instruments, U.S.A.) et une canule-guide (Carnegie Medicin, Suède) est alors implantée dans le striatum droit (A/P : + 0,5 mm ; M/L : - 3,0 mm ; D/V : 3,5 mm par rapport au bregma et à la dure mère ; selon Paxinos & Watson, 1986) à l'aide de deux

vis en acier inoxydable et un amalgame réalisé à l'aide de résine acrylique dentaire (Texton, SS White, Angleterre ; Dentsply DeTrey, Angleterre). Le champ chirurgical est suturé et les animaux sont isolés dans des cages individuelles pour permettre leur récupération. Les expériences de microdialyse se déroulent deux jours après l'intervention chirurgicale.

3.3 EXPÉRIENCES DE MICRODIALYSE

Deux jours après l'implantation de la canule-guide, une sonde (membrane : longueur = 3 mm ; diamètre externe = 0,24 mm ; dialysance, évaluée à l'aide de concentrations connues de glutamate et de dopamine, de l'ordre de 10 à 15 % ; CMA, Suède) est insérée dans la canule puis connectée à une micro-pompe (CMA/100, CMA, Suède) et perfusée avec une solution de Ringer (en mM : NaCl 145 ; KCl 2,7 ; CaCl₂ 1,2 et MgCl₂ 1 ; pH 7,4) au débit de 1,0 µL/min.

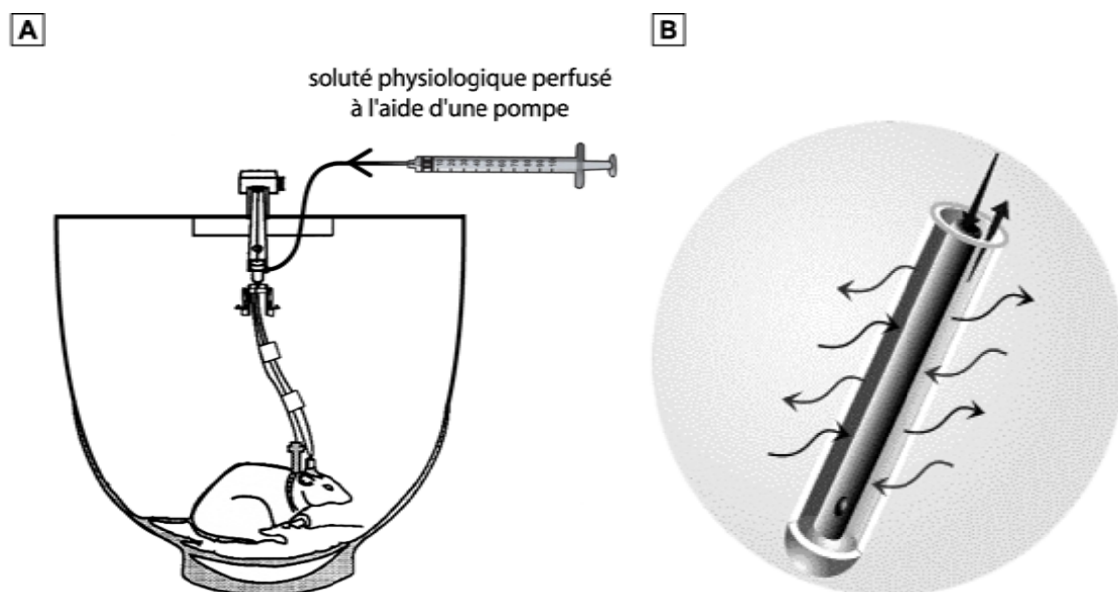


Figure 24 : Microdialyse intracérébrale chez l'animal éveillé.

(A) Une sonde de dialyse est insérée dans le guide préalablement fixé à demeure à l'aide de vis de de résine acrylique. Un soluté physiologique est ensuite perfusé, grâce à une pompe, au débit constant de 1 µL/min. (B) Représentation schématique illustrant la membrane de dialyse fixée à l'extrémité de la sonde. Après une période de 2 heures, un équilibre s'établit entre le compartiment extracellulaire et le soluté perfusant la sonde. Les dialysats sont collectés de manière successive puis analysés par HPLC afin de déterminer leurs contenus en neurotransmetteurs.

Les animaux, placés dans un bol en Plexiglas, sont laissés libres de leurs mouvements (Figure 24). Après une période d'équilibrage de 2 heures, des échantillons successifs de 20 μL sont collectés dans des fioles contenant 10 μL d'une solution glacée d'acide perchlorique (0,1 M) et de cystéine (1 g/L) puis stockés à - 80°C dans l'attente de leur dosage par HPLC. Le volume mort du cathéter, entre la sonde et la fiole de recueil des échantillons est de 10 μL . Ainsi, les mesures de concentration en dopamine et en glutamate sont décalées de 10 min par rapport aux évènements considérés. Les trois premiers échantillons sont utilisés pour déterminer les concentrations basales des dialysats. Seuls les animaux présentant une ligne de base stable sont conservés. Les différents traitements sont ensuite ajoutés au milieu de perfusion, pendant 20 min, et les 4 échantillons suivants sont collectés. Dans les expériences effectuées pour tester la sensibilité des concentrations basales de glutamate et de dopamine à la tétradotoxine (TTX) et à une déplétion en calcium, une solution de TTX (10 μM) ou un milieu dépourvu de calcium (en mM : NaCl 129,5 ; KCl 2,7 et MgCl_2 12,5 ; pH 7,4) sont perfusés pendant 60 min. Dans les expériences de supplémentation de glutamine, cette dernière est perfusée à la concentration de 2,5 mM, pendant une durée de 180 min ou de manière continue dès le début de la dialyse. La position de la sonde dans le striatum est contrôlée après euthanasie, par observation macroscopique au cours de la dissection.

3.4 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LA DÉTERMINATION DE LEUR CONTENU EN NEUROTRANSMETTEURS

À la fin des expériences *in vivo*, les animaux sont euthanasiés par décapitation, leurs cerveaux sont rapidement prélevés, les striata sont disséqués sur de la glace (Glowinski & Iversen, 1966) et homogénéisés par sonication à haute fréquence (70 Hz) au moyen d'un Sonicateur Vibra Cell (Sonics & Materials, U.S.A.), pendant 4 s, dans une solution glacée d'acide

perchlorique (0,1 mol/L) contenant 1g/L de cystéine. Les homogénats sont ensuite centrifugés (10 000 g, 10 min) et les surnageants sont filtrés par pression manuelle à l'aide de filtres de 0,45 µm (Millipore, Irlande), avant d'être dosés par HPLC pour déterminer leur contenu en glutamate, dopamine ou acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC). Les culots sont remis en suspension dans de la soude (0,1 M) et utilisés pour déterminer leur concentration en protéines selon la méthode de Lowry et coll. (1951).

3.4.1 DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS DE DOPAMINE ET DE DOPAC

La dopamine et le DOPAC sont séparés et dosés à l'aide d'un système de chromatographie liquide haute performance couplé à un détecteur électro-chimique (HPLC-EC). Le système HPLC se compose d'une pompe (LC2000, Perkin Elmer, U.S.A) reliée à une colonne de phase inverse (2,0 x 250 mm ; 5 µm ; Beckman-Coulter, U.S.A.) séparant les différents composés en fonction de leur affinité relative pour la phase mobile et la phase stationnaire. La colonne est couplée à un détecteur électro-chimique (Decade, Antec Leyden, Pays-Bas) muni d'une électrode de carbone vitreux au potentiel fixe de 0,8 V (par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl). La phase mobile, composée de KH₂PO₄ (55 mM), de méthanol (64 mL/L), de Pic B7 (23,5 mL/L ; Waters, France) et de Na₂EDTA (0,15 mM), est filtrée et dégazée sous vide à l'aide de filtres Millipore[®] de 0,45 µm avant d'être mise en circulation par la pompe au débit de 0,3 mL/min (pH 3,55). Des échantillons de 20 µL sont introduits dans le système HPLC au moyen d'un injecteur automatique (AS 300, Spectra Physics, U.S.A.). Les chromatogrammes sont enregistrés et intégrés grâce à un système informatisé de type PC, équipé du logiciel Borwin (JMBS Developments, France). La limite de détection à un taux signal/bruit de 3 est inférieure à 5 fmol/µL.

3.4.2 DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS DE GLUTAMATE

Les concentrations de glutamate sont déterminées grâce à un système HPLC, après une réaction de dérivation du glutamate (Figure 25) obtenue par ajout de 15 μL d'échantillon à 15 μL d'une solution contenant 40 mM d'*o*-phthaldialdéhyde, 100 g/L d'éthanol et 4 g/L de 2-mercaptoéthanol dans un tampon borate (0,4 M ; pH 10,4). À l'issue de la réaction, d'une durée minimale de 100 s, la séparation et la détection sont effectuées par un système de chromatographie liquide haute performance à détection électro-chimique (HPLC-EC). Une colonne de phase réverse C18 (2,0 x 250 mm ; 5 μm ; Beckman-Coulter, U.S.A.) est couplée

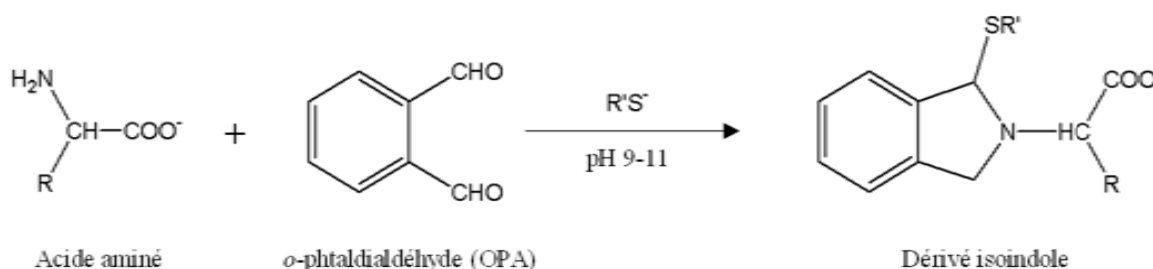


Figure 25 : Réaction de dérivation des acides aminés grâce à l'*o*-phthaldialdéhyde en présence d'un groupement thiol.

L'*o*-phthaldialdéhyde réagit avec tous les acides α -aminés. La réaction produit un dérivé relativement stable qui peut supporter quelques heures d'attente avant d'être dosé. Le réactif est utilisé pour augmenter la sensibilité de détection après la séparation (limite de sensibilité < 1 pmol). Dans notre cas : R = $-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ (glutamate) ; R'S', 2-mercaptoéthanol ; R' = $-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$.

à un détecteur électro-chimique (Decade, Antec Leyden, Pays-Bas) comportant une électrode en carbone vitreux au potentiel fixe de 0,6 V (par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl). La phase mobile, composée de Na_2HPO_4 (0,1 M), de méthanol (270 g/L) et de Na_2EDTA (0,15 mM) à pH 6, est filtrée et dégazée sous vide au travers de filtres Millipore[®] de 0,45 μm avant d'être mise en circulation par une pompe (LC2000, Perkin Elmer, U.S.A.) au débit de 0,3 mL/min. Des échantillons de 20 μL sont ensuite introduits dans le système HPLC au moyen d'un injecteur automatique (AS 300, Spectra Physics, U.S.A.). Les chromatogrammes sont enregistrés grâce à un ordinateur de type PC disposant du logiciel Borwin (JMBS

Developments, France). La limite de détection au ratio signal/bruit de 3 est inférieure à 5 pmol/μL.

3.5 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ GLUTAMINE SYNTHÉTASE

L'activité glutamine synthétase (GS) est mesurée en estimant la quantité d'acide γ -monohydroxamyl L-glutamique (GMH, Figure 26) formée dans un milieu d'incubation adapté de la technique de Rowe et coll. (1970). Les striata sont disséqués sur de la glace selon la méthode de Glowinski & Iversen (1966) puis homogénéisés par sonication à haute fréquence (70 Hz), pendant 4 s, à l'aide d'un Sonicateur Vibra Cell (Sonics & Materials, U.S.A.) dans 5 volumes d'un tampon imidazole glacé (0,1 M) contenant 5 mM de cystéine (pH 7,2). Les homogénats sont centrifugés à 4°C pendant 10 min (10000 g). Les surnageants, à raison de 100 μL, sont ensuite placés à incuber, pendant 15 min et à 37°C, dans un tampon d'incubation contenant 100 mM d'imidazol, 50 mM de L-glutamate, 20 mM d'ATP, 10 mM de β -mercaptoéthanol, 40 mM de MgCl₂ et 100 mM d'hydroxylamine (volume final = 0,5 mL ; pH 7,2). La réaction est arrêtée par ajout de 750 μL d'un réactif ferrique contenant 0,37

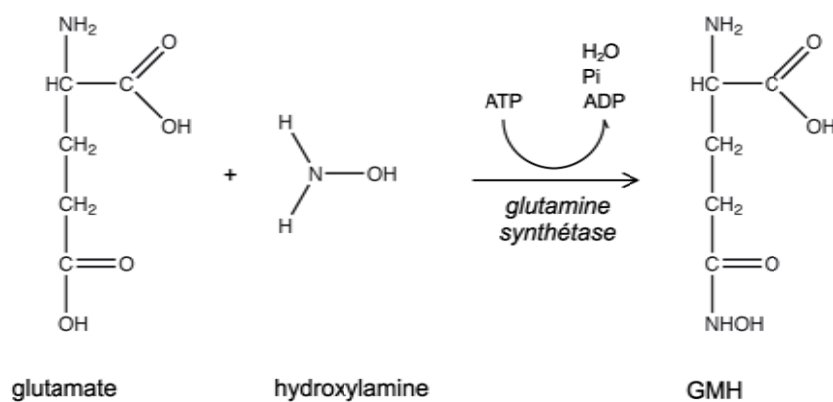


Figure 26 : Réaction de dosage de l'activité glutamine synthétase.

M de FeCl₃ ; 0,67 M d'HCl et 0,2 M d'acide trichloroacétique (TCA). Le mélange résultant est centrifugé à 4°C pendant 10 min (10000 g) et l'absorbance des surnageants est évaluée par spectrophotométrie à 535 nm. Les valeurs d'absorbance sont comparées à une courbe étalon obtenue à l'aide de concentrations connues de GMH. L'activité GS est donc exprimée en nmol de GMH/mg de protéines/min.

3.6 MESURE DE LA CAPTURE SYNAPTOSOMALE DE GLUTAMATE ET DE DOPAMINE

Les animaux sont sacrifiés par décapitation, leurs cerveaux sont rapidement prélevés, les striata sont disséqués sur de la glace selon la méthode de Glowinski & Iversen (1966) et homogénéisés dans 20 volumes de saccharose 0,32 M (à 4°C) à l'aide d'un Potter-Elvehjem (clairance 80-130 mm). Les homogénats sont ensuite centrifugés (1000 g, 10 min, 4°C) et les culots sont éliminés. Le surnageant est utilisé en tant que préparation synaptosomale brute. Des échantillons de cette préparation (50 µL) sont placés à pré-incuber à 37°C pendant 5 min dans un milieu Krebs-Ringer (volume final = 1 mL ; pH 7,4) composé de NaCl (109 mM) ; de CaCl₂ (1 mM) ; de KH₂PO₄ (1,1 mM) ; de NaHCO₃ (27 mM) et de glucose (5,4 mM). Dans les expériences de capture de dopamine, 10 µL d'une solution contenant de la dopamine tritiée ([³H]-dopamine, activité spécifique = 6,6 Ci/mmol ; concentration finale = 20 nM ; Amersham, Royaume Uni) et de la pargyline (concentration finale = 100 µM), un inhibiteur sélectif de la monoamine oxydase B (MAO B), sont ajoutés à la préparation synaptosomale pour une période d'incubation de 5 min à 37°C. Dans les expériences de capture de glutamate, 10 µL d'une solution contenant du glutamate tritié (acide L-[G-³H]-glutamique, activité spécifique = 49,0 Ci/mmol ; concentration finale = 4 nM ; Amersham, Royaume-Uni) et de l'acide 3-mercaptopropionique (concentration finale = 10 µM), un inhibiteur de l'acide glutamique décarboxylase (GAD). La réaction est arrêtée par une dilution, obtenue en

ajoutant 2 mL de tampon d'incubation glacé, suivie d'une centrifugation (3000 g ; 10 min) à 4°C. Le culot est rincé et centrifugé à nouveau avant d'être remis en suspension dans de l'eau distillée. Des fractions de cette suspension (50 µL) sont utilisées pour déterminer leur radioactivité par la technique de scintillation liquide (Betamatic V, Kontron, France), dans 4 mL de liquide scintillant Ultima Gold (Packard Instrument, Pays-Bas). D'autres fractions de cette suspension sont utilisées pour évaluer le contenu en protéines selon la méthode de Lowry et coll. (1951). La capture spécifique de dopamine ou de glutamate est obtenue par la différence entre la capture totale mesurée à 37°C et l'accumulation non spécifique obtenue à 0°C.

3.7 MESURE DE LA DENSITÉ DES SITES DE LIAISON DE LA [³H]-DPDPE SUR MEMBRANES STRIATALES

Une analyse Scatchard de la radioliasion de DPDPE tritiée (³H]-DPDPE), isotope radioactif de l'agoniste sélectif des récepteurs opioïdes de type δ, à des échantillons de membranes striatales, purifiées à partir d'animaux témoins, est effectuée dans le but de déterminer la valeur du K_D et de la B_{max} dans nos conditions expérimentales (Figure 36). Des échantillons de membranes obtenues à partir d'animaux témoins sont placés à incuber pendant 3 heures à 37°C en présence de [³H]-DPDPE (gamme de concentrations de 0 à 25 nM). À l'issue de cette analyse, la concentration de 4 nM a été retenue pour les expériences ultérieures.

Les animaux sont euthanasiés par décapitation. Leurs striata, rapidement prélevés et disséqués sur de la glace selon la méthode de Glowinski & Iversen (1966), sont homogénéisés dans 20 volumes d'un tampon Tris-HCl glacé (50 mM ; pH 7,4) au moyen d'un Potter-Elvehjem (clairance 80-130 mm). Les homogénats sont ensuite centrifugés (17 000 g ; 20 min ; 4°C). Les culots sont remis en suspension par sonication à haute fréquence (70 Hz), pendant 5 s,

grâce à un Sonicateur Vibra Cell (Sonics & Materials, U.S.A) dans 250 µL de tampon Tris-HCl. La concentration en protéines de chaque échantillon est ajustée à 400 µg après dosage par la méthode de Lowry et coll. (1951). Des échantillons de membranes (50 µL) sont placés à incuber à 37°C, pendant 3 heures, dans le tampon Tris-HCl contenant 4 nM de [³H]-DPDPE (activité spécifique = 45 Ci/mmol ; Amersham, Royaume-Uni). L'incubation est arrêtée par dilution et rinçage grâce à 40 mL de tampon Tris glacé et par une filtration sous vide rapide au travers de filtres en fibre de verre GF/B (Whatman, Angleterre) mis préalablement à tremper, pendant 1 heure au moins, dans une solution de tampon Tris-HCl contenant 1 % de polyéthylèneimine. La radioactivité retenue par les filtres est mesurée par la technique de scintillation liquide (Betamatic V, Kontron, France) dans 4 mL de liquide scintillant Ultima Gold (Packard Instrument, Pays-Bas). Chaque mesure est effectuée en double et la liaison spécifique de [³H]-DPDPE est définie comme la différence entre les taux de radioliation observés en absence et en présence de 100 µM de naltrindole (antagoniste sélectif des récepteurs opioïdes de type δ). La liaison spécifique du ligand est exprimée en pmol/mg de protéines.

3.8 RÉALISATION ET COLORATION DE COUPES HISTOLOGIQUES AU CRÉSYL VIOLET

Les animaux sont euthanasiés ; leurs cerveaux sont rapidement prélevés et les tissus sont fixés par immersion pendant une nuit dans une solution contenant 1 % de paraformaldéhyde. Les cerveaux sont ensuite inclus dans de la paraffine. Le bloc de paraffine est détaillé, à l'aide d'un microtome, en coupes de 20 µm qui sont déposées sur des lames de verre. Les lames sont plongées pendant 5 min dans une solution composée de crésyl violet (5 g/L) et d'acétate de sodium (1 g/L). Elles sont ensuite rincées par immersion rapide dans de l'eau, puis dans deux bains successifs d'éthanol (à respectivement 50 et 70 %). À l'issue de ces différents

rinçages, les lames sont placées pendant 5 min dans un bain contenant 95 % d'éthanol (opération répétée 2 fois) puis 3 min dans un bain d'éthanol à 100 % (à 2 reprises). Enfin, les lames sont immergées pendant 2 x 3 min dans une solution de méthylcyclohexane avant d'être assemblées à des lamelles lutées au glyceel (Gurr, Royaume-Uni). Après séchage, les lames sont placées sur un banc optique surmonté par une caméra reliée à un système d'analyse d'image informatisé Alcatel TITN Answare (SAMBA).

3.9 ÉPREUVE DES ROTATIONS INDUITES PAR L'AMPHÉTAMINE OU L'APOMORPHINE

Quinze jours après l'injection de 6-OHDA dans le MFB (Figure 27), l'efficacité de la lésion est évaluée au niveau comportemental par la mesure du nombre de rotations induites par l'amphétamine ou l'apomorphine. Pour ce faire, une solution d'amphétamine (2,5 mg/kg) ou d'apomorphine (0,5 mg/kg) est injectée par voie *i.p.* à l'animal, sous un volume de 5 mL/kg. Ce dernier est ensuite placé pendant 1 heure dans un compartiment en Plexiglas (L = 20 cm ; l = 20 cm ; H = 30 cm). Le recueil des données débute 20 min après l'injection et est réalisé par tranches d'observation de 5 min, espacées chacune de 5 min. Les rotations sont comptabilisées en fonction de leur sens et de leur pertinence. Trois types de valeurs sont ainsi collectés pour chaque traitement :

- **Amphétamine** : le nombre de **tours horaires** réalisés sans interruption, le nombre de tours horaires réalisés avec interruption et le nombre de tours antihoraires ;
- **Apomorphine** : le nombre de **tours antihoraires** réalisés sans interruption, le nombre de tours antihoraires réalisés avec interruption et le nombre de tours horaires.

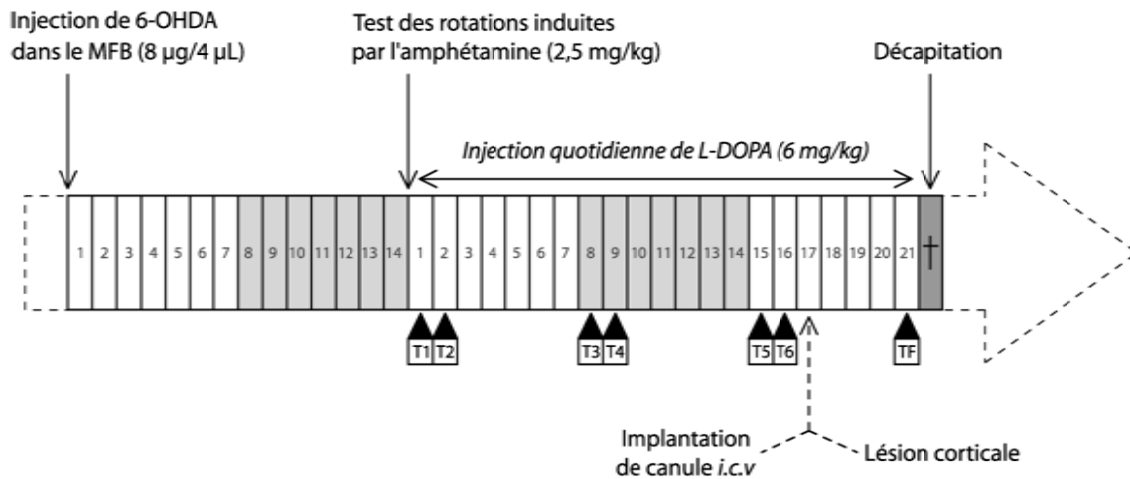


Figure 27 : Représentation chronologique des différentes interventions effectuées au cours du protocole des dyskinésies induites par la L-DOPA.

Les expériences se déroulent sur une période totale de 5 semaines. Le premier jour, les animaux reçoivent une injection unilatérale de 6-OHDA dans le MFB (8 µg dans une solution de 4 µL). Le test des rotations induites par l'amphétamine (2,5 mg/kg) est effectué 15 jours plus tard, afin de vérifier l'efficacité de la lésion. Le jour suivant, les animaux sont soumis au traitement chronique par la L-DOPA (6 mg/kg + 15 mg/kg de benserazide, à raison d'une injection *i.p.* quotidienne). Chacune des 3 semaines de traitements, deux tests d'évaluation des mouvements involontaires et anormaux sont consécutivement effectués (T1 à T6). La dernière semaine de traitement, les animaux sont soumis à un test supplémentaire (TF : test final). Au préalable (4 jours plus tôt), une seconde intervention chirurgicale est réalisée, dans le but d'installer les canules nécessaires aux injections *i.c.v.* et, le cas échéant, de procéder à la lésion du cortex ipsilatéral. Le lendemain du test final, les animaux sont euthanasiés par décapitation. Leurs cerveaux sont prélevés et soumis à diverses analyses neurochimiques.

Les animaux sont ensuite répartis de manière homogène dans chaque groupe en fonction de leur score de rotation. Pour révéler des différences éventuelles entre les résultats obtenus par les deux types de tests, les rotations induites par l'amphétamine et l'apomorphine sont évaluées sur une même série d'animaux, avec un jour d'intervalle entre les deux injections.

3.10 ÉTUDE DES MOUVEMENTS INVOLONTAIRES ANORMAUX

Le jour suivant l'évaluation de l'intensité de la lésion induite par la 6-OHDA grâce au test des rotations, les animaux sont traités de manière chronique par la L-DOPA. Pendant 21 jours, ils reçoivent, chaque matin entre 9 heures et 12 heures, une injection *i.p.* d'une solution

contenant 6 mg/kg de L-DOPA et 15 mg/kg de bensérazide, un inhibiteur périphérique de la DOPA décarboxylase.

Les mouvements involontaires anormaux induits par le traitement à la L-DOPA chez des animaux « hémi-parkinsoniens » (lésés unilatéralement à la 6-OHDA) sont évalués deux jours consécutifs par semaine, au cours des 3 semaines de traitement (Figure 27). Chaque série d'observations se déroule entre 9 heures et 12 heures. Une fois l'injection de L-DOPA effectuée, l'animal est placé au fond d'une cage en Makrolon (L = 37 cm ; l = 22 cm ; H = 17 cm), dans une pièce où la luminosité est fixée à 25 lux. Les observations débutent 20 min plus tard. Chaque animal est alors observé pendant 1 min, toutes les 20 min, sur une période totale de 3 heures.

Les animaux peuvent exprimer plusieurs types de mouvements involontaires et anormaux (Figure 28) :

- les **dyskinésies axiales** caractérisées par une torsion axiale du cou et du tronc, de manière contralatérale à la lésion ;
- les **dyskinésies oro-linguales** représentées par des mouvements masticatoires répétitifs (en absence de nourriture), avec éventuellement une sortie de la langue à l'extérieur de la cavité buccale ;
- les **dyskinésies de la patte** qui s'illustrent par des mouvements saccadés et répétitifs de la patte contralatérale à la lésion ;
- les **dyskinésies locomotrices** dans lesquelles l'animal effectue des rotations répétitives dans le sens contralatéral à la lésion.

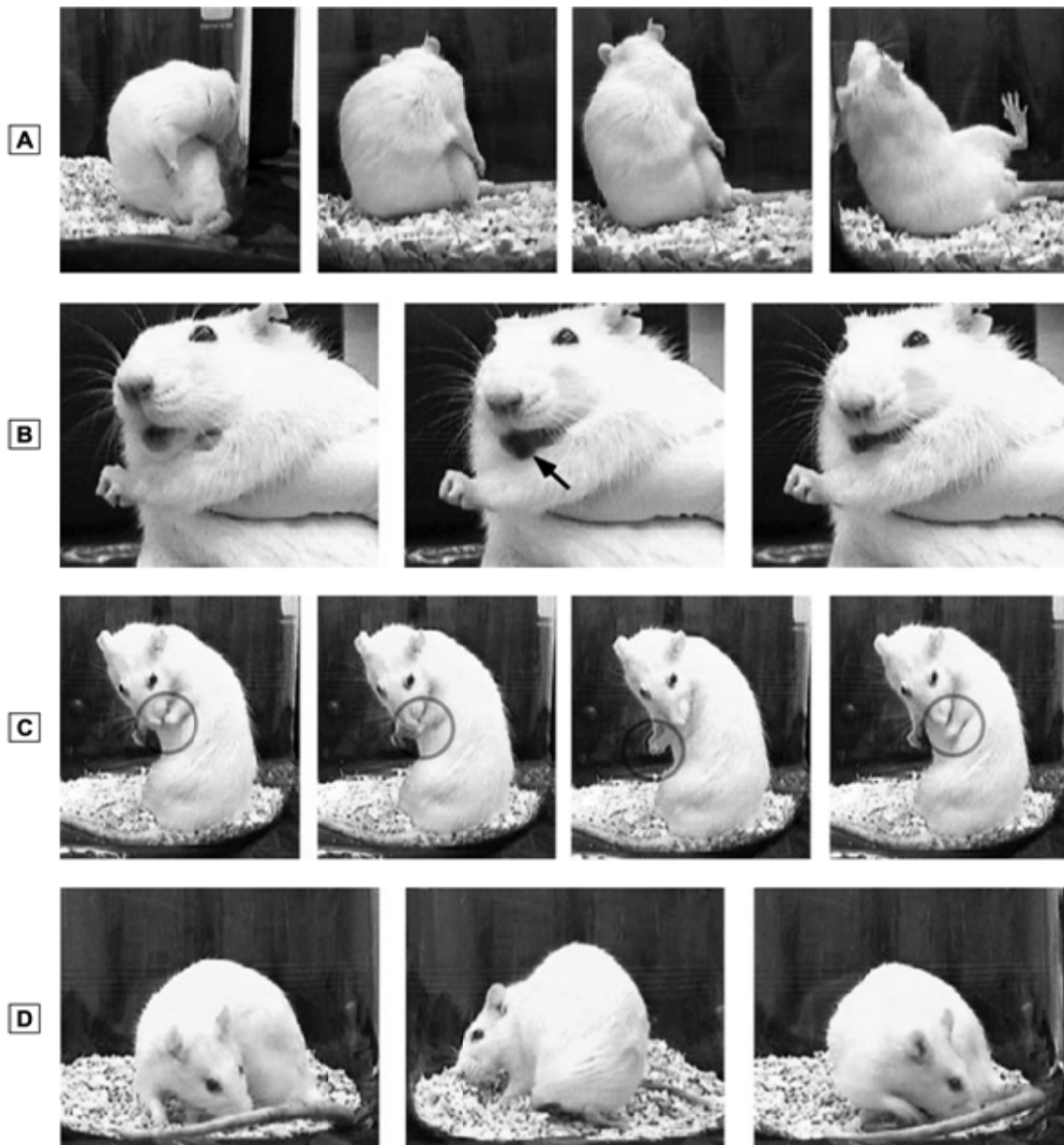


Figure 28 : Mouvements involontaires et anormaux exprimés par le rat hémiparkinsonien traité par la L-DOPA.

Les photographies illustrent les différents types de mouvements involontaires présentés par les animaux en réponse au traitement par la L-DOPA. (A) Dyskinésies axiales caractérisées par une torsion du tronc et du cou dans le sens contralatéral à la lésion. Dans les cas les plus sévères, la torsion du corps est telle que les animaux peuvent en perdre l'équilibre. (B) Les dyskinésies de type oro-lingual s'illustrent par des mouvements répétitifs de la mâchoire et de la langue (indiquée par la flèche), dans le sens contralatéral à la lésion. (C) Les dyskinésies de la patte, mises en évidence sur les images par des cercles, sont caractérisées par des mouvements répétitifs de la patte avant contralatérale. (D) Les manifestations motrices correspondent à des rotations contralatérales (d'après *Winkler et coll., 2002*).

Chaque type de mouvement involontaire et anormal est quantifié en fonction de son intensité selon les critères suivants :

- le score 0 est attribué lorsque l'animal n'exprime pas le mouvement dyskinétique considéré au cours de la minute d'observation ;
- le score 1 est attribué lorsque le mouvement dyskinétique considéré est exprimé pendant un temps inférieur à 30 s ;
- le score 2 est attribué si l'animal exprime le mouvement dyskinétique considéré pendant plus de 30 s ;
- le score 3 est attribué lorsque le mouvement considéré est exprimé au cours de toute la minute d'observation mais que l'animal réagit à un stimulus tactile ;
- le score 4 est attribué si l'animal exprime le mouvement considéré au cours de toute la minute d'observation et qu'il ne réagit pas à un stimulus tactile.

L'expression des mouvements dyskinétiques de type locomoteur étant incompatible avec celle des trois autres types de mouvements involontaires anormaux, les animaux exprimant fortement ce comportement (score supérieur ou égal à 2) sont, après la première minute d'observation, contraints pendant 30 s à adopter une position bipède. À l'issue de cette contention, l'animal est à nouveau laissé libre de ses mouvements pendant une période de 30 s et l'évaluation de l'intensité des mouvements involontaires anormaux s'effectue conformément à celle effectuée lors de la première minute d'observation. En raison de leur caractère controversé, en regard notamment de leur signification par rapport à l'expression des mouvements dyskinétiques induits par la L-DOPA chez l'Homme, les mouvements involontaires anormaux de type locomoteur ont été dissociés des 3 autres types de dyskinésies et n'ont pas été analysés.

Le dernier jour de traitement chronique par la L-DOPA, les animaux reçoivent, 10 min après l'injection de L-DOPA, une injection de DPDPE (10 µg), de naltrindole (10 µg) ou de soluté physiologique. L'injection est réalisée par voie *i.c.v.*, via la canule-guide préalablement fixée à demeure dans le ventricule latéral droit, sous un volume de 5 µL et au débit de 12 µL/min. Les animaux sont ensuite replacés dans leur cage afin d'évaluer les effets de ces traitements sur l'intensité des mouvements dyskinétiques induits par la L-DOPA.

3.11 ORIGINE DES SUBSTANCES UTILISÉES ET PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Nous avons utilisé les substances suivantes :

- la DPDPE, agoniste des récepteurs opioïdes de type δ , est fournie par Sigma (France) et solubilisée dans du Ringer (pH ajusté à 7,4) ;
- le Naltrindole, antagoniste des récepteurs opioïdes de type δ , est fourni par Sigma (France) et solubilisé dans du Ringer (pH ajusté à 7,4) ;
- l'acide *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylique (PDC), inhibiteur de capture du glutamate, est fourni par Sigma (France) et solubilisé dans du Ringer (pH ajusté à 7,4) ;
- l'acide *L- α* -aminoadipique (*L- α AA*), toxine sélective des cellules gliales, est fourni par Sigma (France) et solubilisé dans du Ringer (pH ajusté à 7,4) ;
- le [³H]-L-glutamate (activité 49 Ci/mmele ; 1 mCi/mL) est fourni par Amersham (France) ;
- la [³H]-dopamine (activité 6,6 Ci/mmele ; 1 mCi/mL) est fournie par Amersham (France) ;
- la [³H]-DPDPE (activité 42 Ci/mmele ; 1 mCi/mL) est fournie par NEN (France).

3.12 ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés par la moyenne des valeurs individuelles obtenues pour un même traitement ou une condition expérimentale identique. L'écart-type à la moyenne (SEM) lui correspondant est obtenu par la formule $SEM = \sqrt{(s^2/n)}$ où s^2 représente la variance et n le nombre de valeurs utilisées par lot. Sur les figures, les résultats sont représentés sous forme de courbes ou d'histogrammes présentant des segments verticaux qui correspondent aux SEM. Les comparaisons statistiques de plusieurs moyennes sont généralement effectuées grâce à une analyse de variance à un, deux ou trois facteurs si nécessaire, suivie par un test « *post-oc* » de Tukey. Dans certains cas, l'analyse statistique est opérée au moyen du test t de Student.

Les données de microdialyse sont exprimées en % des valeurs de base évaluées sur les trois premiers échantillons et l'analyse statistique est effectuée à partir de ces données (les contenus moyens en dopamine et en glutamate sont également exprimés pour chaque groupe en concentrations). Toutes les analyses statistiques sont effectuées grâce aux logiciels SigmaStat (SPSS Inc., U.S.A) et Statview (SAS Institute Inc., U.S.A). La probabilité est considérée comme significative lorsque $P < 0,05$.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 1

4.1 RÔLE DES NEURONES CORTICO-STRIATAUX DANS LA LIBÉRATION STRIATALE DE DOPAMINE INDUITE PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ

L'augmentation des taux extracellulaires de dopamine résultant *in vitro* ou *in vivo* de la stimulation des récepteurs opioïdes de type δ est largement documentée (Petit et coll., 1986 ; Chesselet et coll., 1981 ; Dourmap et coll., 1990 ; Spanagel et coll., 1990 ; Pentney & Gratton, 1991 ; Dourmap et coll., 1992). Les travaux précédemment effectués dans notre laboratoire ont notablement contribué à mettre en évidence la stimulation exercée *in vivo* par l'infusion striatale d'un agoniste des récepteurs δ , la [D-Pen²,D-Pen⁵]-enképhaline (DPDPE) sur la libération de dopamine (Dourmap et coll., 1990 ; Dourmap et coll., 1992) et ont, en outre, indiqué que cet effet est aboli par le CPP (3-[(±)-2-carboxypiperazine-4-yl]-propionyl-1-phosphonate), un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (Dourmap & Costentin, 1994). Ce résultat laissait supposer une implication des neurones glutamatergiques dans l'effet de la DPDPE sur la libération de dopamine. Bien que le glutamate striatal puisse avoir diverses origines, les neurones provenant du cortex cérébral en constituent la principale source (Donoghue & Herkenham, 1986 ; Parent & Hazrati, 1995a). De plus, il a précédemment été montré que l'augmentation des concentrations extracellulaires de dopamine résultant, dans le striatum, d'une stimulation des récepteurs opioïdes de type δ est indépendante des neurones dont les corps cellulaires sont localisés à l'intérieur même du striatum (Dourmap et coll., 1992). Pour explorer l'hypothèse selon laquelle le glutamate pourrait être impliqué dans la libération striatale de dopamine induite les récepteurs δ , nous avons tout d'abord étudié l'influence d'une lésion du cortex ipsilatéral sur la libération striatale de dopamine induite par la DPDPE. Dans un second temps, nous avons recherché l'influence de la DPDPE sur les taux extracellulaires de glutamate dans le striatum d'animaux préalablement soumis ou non à cette lésion corticale. Enfin, nous avons évalué l'effet de la

déafférentation cortico-striatale sur la radiolisation de [³H]-DPDPE à des préparations membranaires purifiées à partir du striatum.

4.1.1 CHOIX DU MODÈLE LÉSIONNEL ET INFLUENCE DE LA LÉSION CORTICALE SUR LES CARACTÉRISTIQUES ANATOMIQUES ET NEUROCHIMIQUES DU STRIATUM

Il n'existe pas de toxine sélective des neurones glutamatergiques. La lésion des afférences corticales du striatum peut être, en revanche, obtenue par destruction mécanique (ablation chirurgicale, aspiration, transection des fibres cortico-striatales), chimique (injection des substances toxiques ou corrosives) ou physique (coagulation par le chaud ou le froid). Parmi ces différentes méthodes, nous avons fait le choix de la thermo-coagulation *in situ* pour sa facilité et sa rapidité de mise en œuvre, ainsi que pour sa bonne reproductibilité. Techniquement, la destruction du cortex y résulte de l'échauffement d'une l'électrode, directement positionnée dans le tissu cérébral, sous l'effet d'un courant, produit par un générateur de radiofréquences, dont l'intensité et la durée peuvent être paramétrées.

4.1.1.1 ÉVALUATION SUR COUPES STRIATALES COLORÉES AU CRÉSYL VIOLET DE L'ÉTENDUE DE LA LÉSION PRODUITE PAR THERMO-COAGULATION DU CORTEX

Deux jours après la lésion produite par thermo-coagulation, une destruction du cortex fronto-pariétal est observée à partir de coupes frontales colorées au crésyl violet (Figure 29, A et B). Au niveau ventral, la lésion atteint le corps calleux mais l'intégrité du striatum reste préservée. Néanmoins, l'analyse histologique révèle une réduction de la taille du striatum ipsilatéral à la décortication. En effet, l'aire totale du striatum ipsilatéral (évaluée à partir du second plan de coupe présenté sur la Figure 29B) est significativement diminuée chez les animaux lésés par rapport au striatum contralatéral (respectivement $9,7 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ vs. $12,5 \pm$

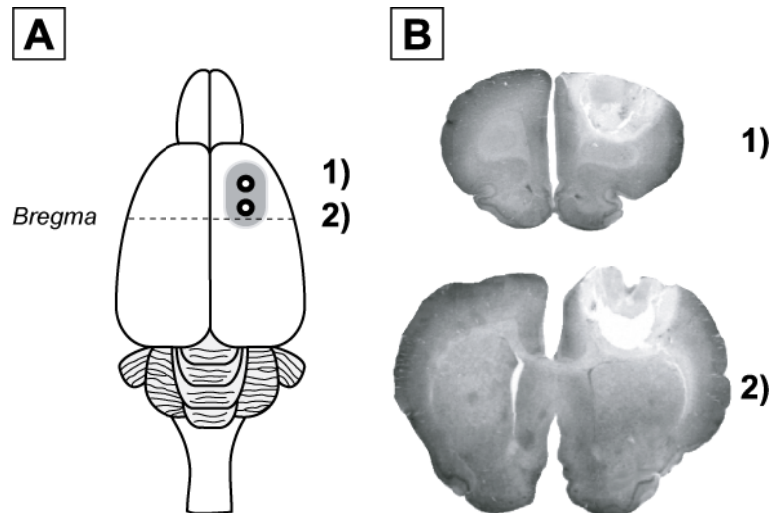


Figure 29 : Évaluation sur des coupes striatales colorées au crésyl violet de l'étendue de la lésion produite par thermo-coagulation du cortex.

(A) La lésion des neurones cortico-striataux est effectuée par thermo-coagulation du cortex frontal droit, en deux points selon l'atlas de Paxinos & Watson (1986) (A/P + 3,4 et + 0,5 mm ; M/L - 3,0 mm ; D/V respectivement - 1,0 et - 0,8 mm), avec une intensité de 15 V et un temps d'application de 50 s. Le territoire cortical détruit par la lésion inclut la majorité du cortex frontal et une petite partie du cortex pariétal. (B) Coupes cérébrales effectuées au niveau des deux points décrits en A), colorées au crésyl violet et photographiées en niveaux de gris.

0,4 mm² ; - 22,4 % ; $t = 3,3$; $p < 0,01$; $n = 8$) ou au striatum ipsilatéral d'animaux témoins (respectivement $9,7 \pm 0,8$ mm² vs. $11,9 \pm 0,5$ mm² ; - 18,6 % ; $t = 2,49$; $p < 0,05$; $n = 8$). Cependant, le nombre total de neurones (évalué, à partir du même plan de coupe, sur une large portion striatale dorso-médiane) dans le striatum ipsilatéral à la décortication n'est pas significativement modifié par rapport au striatum contralatéral (respectivement $13\,500 \pm 1\,347$ neurones vs. $15\,044 \pm 730$ neurones ; $t = 1,0$; $p > 0,05$; $n = 8$) ou au striatum ipsilatéral d'animaux non lésés (respectivement $13\,500 \pm 1\,347$ neurones vs. $14\,120 \pm 828$ neurones ; $t = 0,4$; $p > 0,05$; $n = 8$). Ces résultats indiquent que, comparativement au striatum ipsilatéral d'animaux témoins, la réduction du volume striatal s'accompagne chez les animaux lésés d'une augmentation de la densité cellulaire (respectivement $1\,188 \pm 58$ neurones / mm² vs. $1\,395 \pm 75$ neurones / mm² ; + 17,4 % ; $t = - 2,192$; $p < 0,05$; $n = 8$) et donc que, bien qu'affectant une large partie du cortex fronto-pariétal, la lésion préserve néanmoins l'intégrité des neurones du striatum. Cette diminution de la taille du striatum ipsilatéral pourrait être en

partie due à une raréfaction des afférences cortico-striatales résultant de la lésion du cortex. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que cette modification morphologique puisse aussi en partie résulter d'une perte de la protection mécanique assurée par le cortex ipsilatéral.

4.1.1.2 EFFET DE LA LÉSION CORTICALE SUR LA TRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE STRIATALE

Comme résumé dans la Table 9, la lésion du cortex par thermo-coagulation produit, deux jours plus tard, une diminution significative du contenu total en glutamate dans le striatum ipsilatéral ($63,4 \pm 16,8$ nmol/mg de protéines dans le striatum ipsilatéral à la lésion vs. $91,0 \pm 20,7$ nmol/mg de protéines dans le striatum contralatéral ; - 30,3 % ; $F(1,18) = 18,74$; $p < 0,001$; $n = 10$). En revanche, la concentration de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum ipsilatéral n'est pas significativement réduite chez les animaux lésés au niveau du cortex ($15,8 \pm 3,5$ pmol/min vs. $22,6 \pm 3,6$ pmol/min pour les animaux témoins ; $t = 1,35$; $p > 0,05$; $n = 20$; Table 9), bien qu'une tendance à la diminution paraisse néanmoins se dégager (- 30,1 % ; $p > 0,05$; $n = 20$). Deux jours après la lésion corticale, la capture synaptosomale de glutamate radioactif n'est pas altérée dans le striatum ipsilatéral des animaux lésés ($1,00 \pm 0,19$ pmol/mg de protéines) par rapport à celui des animaux témoins ($0,98 \pm 0,15$ pmol/mg de protéines ; $F(1,19) = 1,849$; $p > 0,05$; $n = 10$; Table 9).

Comme l'illustre la Figure 30, la capture synaptosomale de glutamate (exprimée en % des rapports [striatum droit]/[striatum gauche]) n'est réduite, par rapport à des animaux contrôles, que 8 jours après la lésion du cortex ipsilatéral ($113,1 \pm 9,0$ % vs. $66,8 \pm 5,6$ % ; - 40,9 % ; $F(4,43) = 2,868$; $p = 0,025$; $n = 8$ à 10).

Le glutamate striatal peut provenir de différentes sources : des neurones cortico-striataux, qui représentent la principale innervation du striatum (Kemp & Powell, 1971 ; Vuillet et coll., 1989), et qui sont principalement originaires du cortex ipsilatéral ou secondairement du cortex

	Témoins	Lésés		Statistiques	
	Striatum ipsilatéral	Striatum contralatéral	Striatum ipsilatéral	(a)	(b)
Concentration striatale de glutamate (nmol/mg de protéines)	77,1 ± 14,0	91,0 ± 20,7	63,4 ± 16,8	NS	*** (-30,3%)
Capture synaptosomale de glutamate (pmol/mg de protéines)	0,98 ± 0,15	1,15 ± 0,18	1,00 ± 0,19	NS	NS
Concentration extracellulaire basale de glutamate (pmol/min)	22,6 ± 3,6	ND	15,8 ± 3,5	NS	NS
Concentration striatale de dopamine (nmol/mg de protéines)	2,7 ± 0,5	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,4	NS	NS
Concentration striatale de DOPAC (nmol/mg de protéines)	0,51 ± 0,14	0,42 ± 0,09	0,50 ± 0,12	NS	NS
Capture synaptosomale de dopamine (pmol/mg de protéines)	64,1 ± 9,7	61,2 ± 14,7	82,6 ± 25,2	NS	NS
Concentration extracellulaire basale de dopamine (fmol/min)	31,8 ± 5,8	ND	30,2 ± 8,3	NS	NS

Table 9 : Modifications neurochimiques induites dans le striatum deux jours après la lésion du cortex ipsilatéral.

Les différents paramètres neurochimiques sont mesurés 2 jours après une thermocoagulation unilatérale du cortex. Chaque paramètre est mesuré dans le striatum ipsilatéral et contralatéral à la lésion ainsi que dans le striatum ipsilatéral des animaux témoins. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées au moyen du test t de Student apparié ou non (n = 7 à 20). (a) vs. striatum ipsilatéral du groupe témoin ; (b) vs. striatum contralatéral du groupe soumis à lésion corticale (test apparié).

contralatéral (McGeorge & Faull, 1989), des neurones thalamo-striataux (Berendse & Groenewegen, 1990) ainsi que des cellules gliales ou encore de neurones non glutamatergiques via le cycle de Krebs. Ainsi, la forte réduction de la concentration de glutamate dans le striatum, deux jours après la lésion du cortex fronto-pariétal ipsilatéral, suggère une importante diminution du nombre de terminaisons cortico-striatales. Ce résultat est similaire à ceux précédemment publiés (Hassler et coll., 1982 ; Butcher & Hamberger, 1987 ; Warenycia et coll., 1987 ; Desole et coll., 1992). Hassler *et coll.* (1982) et Desole et coll. (1992) ont également rapporté, à respectivement 7 et 12 jours postlésionnels, une diminution des taux de glutamate dans le striatum contralatéral qui, en accord avec nos résultats, ne fut cependant pas observée par l'équipe de Sandberg 2 jours après la lésion (Sandberg et coll., 1985).

De manière inattendue, les concentrations basales de glutamate, évaluées par microdialyse, ne sont pas significativement diminuées, comparativement aux animaux témoins, bien qu'une tendance en ce sens semble apparaître. L'interprétation de ce résultat est délicate en raison du

Capture synaptosomale de glutamate (% des rapports [côté droit]/[côté gauche])

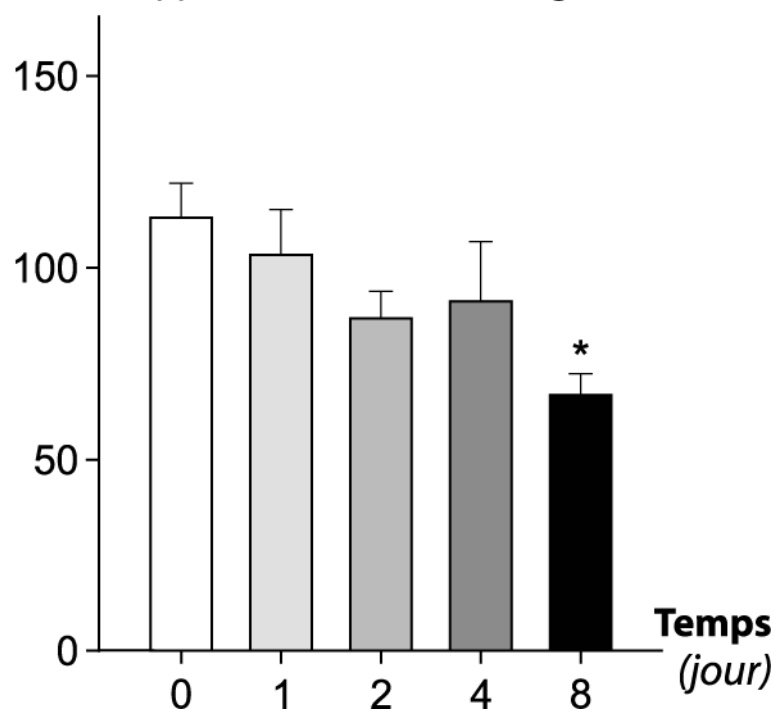


Figure 30 : Évolution de la capture synaptosomale de glutamate dans le striatum après lésion du cortex ipsilatéral.

La lésion des neurones cortico-striataux est effectuée par thermo-coagulation du cortex frontal droit, en deux points selon l'atlas de Paxinos & Watson (1986) (A/P + 3,4 et + 0,5 mm ; M/L - 3,0 mm ; D/V respectivement - 1,0 et - 0,8 mm), avec une intensité de 15 V et un temps d'application de 50 s. La capture de [³H]-glutamate (4 nM) est évaluée sur des préparations synaptosomales préparées à partir du striatum ipsilatéral à différents temps post-lésionnels (1, 2, 4 et 8 jours). Les données sont exprimées en % des rapports [capture spécifique dans le striatum ipsilatéral] / [capture spécifique dans le striatum contralatéral]. Les moyennes ± S.E.M. pour 8 à 10 rats par groupe sont comparées grâce à une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. * P < 0,05 vs. groupe témoin.

fait que notre approche expérimentale, dépourvue de calibration stricte de la dialysance des sondes, ne permet pas de déterminer précisément la concentration extracellulaire de base. À cet effet, l'emploi de la technique du « flux net nul » (en anglais « *zero-net-flux* ») aurait été plus adapté. Brièvement, cette méthode de calibration, initialement décrite par Lonroth et coll. (1987), consiste à perfuser la sonde avec des concentrations en analyte encadrant la concentration extracellulaire supposée et à déterminer la concentration à laquelle le flux net de concentration par rapport aux dialysats devient nul. Notre résultat semble cependant en accord avec les travaux de Young & Bradford (1986) qui, comparativement à des animaux

témoins, n'ont décrit aucune altération des taux extracellulaires de glutamate dans le striatum d'animaux ayant subi deux jours plus tôt une lésion du cortex ipsilatéral. Comme, dans le même temps, le contenu striatal total en glutamate est réduit de manière significative, ce résultat pourrait refléter un processus adaptatif visant à maintenir la transmission glutamatergique dans le striatum. De nombreux mécanismes adaptatifs, tels qu'une gliose réactionnelle accompagnée d'une réorganisation des neurones cibles (Cheng et coll., 1994 ; Szele et coll., 1995), que des modifications dans l'expression de gènes impliqués dans la synaptogenèse (Cheng et coll., 1997a) ou encore la formation de nouvelles synapses par prolifération d'axones originaires du cortex contralatéral (Napieralski et coll., 1996), ont été identifiés dans le striatum 7 à 21 jours après lésion du cortex ipsilatéral. En outre, Carmichael & Chesselet (2002) ont rapporté l'existence d'adaptations postlésionnelles précoces affectant directement la neurotransmission, en démontrant qu'une lésion corticale par thermo-coagulation induit, entre 1 et 3 jours après la lésion, l'apparition de séquences d'activité neuronale, synchronisées et à basse fréquence, dans la région corticale périlésionnelle, ainsi que dans le cortex contralatéral. L'absence de significativité de la réduction que nous avons observée, 2 jours après la thermo-coagulation du cortex, au niveau des taux extracellulaires de glutamate dans le striatum ipsilatéral pourrait, par conséquent, refléter la mise en place de mécanismes adaptatifs visant à rétablir des concentrations extracellulaires physiologiques en glutamate. Compte tenu de la destruction physique opérée instantanément par la thermo-coagulation du cortex et du fait, que deux jours plus tard, les concentrations striatales de glutamate sont réduites de manière significative, il est en revanche peu probable que, simultanément, cette tendance puisse refléter une persistance de fonctionnalité de terminaisons cortico-striatales en cours de dégénérescence. Nous ne pouvons, par ailleurs, pas exclure la possibilité que cette tendance ne résulte que d'une simple variabilité interindividuelle.

De manière intéressante, la mesure des taux de capture de glutamate sur des synaptosomes préparés à partir du striatum ipsilatéral, 2 jours après déafférentation cortico-striatale, ne met en évidence qu'une faible tendance à la réduction. Parmi les 5 protéines identifiées comme des transporteurs du glutamate, dont les gènes ont été clonés à partir de cerveaux de mammifères, seules GLT-1, GLAST et EAAC1 sont exprimées chez les rongeurs. Dans le striatum de Rat, les transporteurs GLT-1 et GLAST apparaissent restreints aux astrocytes (Lehre et coll., 1995) alors qu'EAAC1, dont les terminaisons axonales sont dépourvues (Rothstein et coll., 1994), est exprimé par des éléments postsynaptiques (dendrites des neurones épineux de taille moyenne). Cependant, dans la continuité des travaux de Divac et coll. (1977), plusieurs investigateurs ont interprété les diminutions marquées des taux de capture de glutamate après lésion corticale comme une preuve de l'existence de sites de capture du glutamate sur les terminaisons des neurones cortico-striataux. L'existence de sites de capture neuronaux du glutamate localisés au niveau présynaptique a été démontrée (Gundersen et coll., 1993 ; Gundersen et coll., 1996) et ces sites sont considérés comme correspondant à un variant d'épissage du transporteur GLT-1 (Chen et coll., 2002 ; Schmitt et coll., 2002). Cependant, Sullivan et coll. (2004) ont réfuté une localisation neuronale pour les deux variants de GLT-1 identifiés dans le cerveau de Rat (GLT-1 α et GLT-1 ν). Le concept de capture présynaptique du glutamate dans le striatum de Rat est néanmoins généralement admis, du fait notamment des résultats des études lésionnelles. Or, dans la majorité de ces études, le délai entre les expériences de capture de glutamate et la décortication est habituellement supérieur ou égal à 5 jours (Divac et coll., 1977 ; Levy et coll., 1995 ; Lievens et coll., 2000). Comme Ginsberg et coll. (1995) effectuant leurs observations 3 jours après la lésion du cortex, nous n'avons observé, 2 jours plus tard, aucune réduction significative de la capture de glutamate opérée par des synaptosomes préparés à partir du striatum ipsilatéral. Le fait que, simultanément, le contenu du striatum en glutamate soit fortement affecté suggère

une prévalence des sites de capture gliaux au sein des préparations synaptosomales brutes. En effet, Nakamura et coll. (1993) ont observé, dans des préparations synaptosomales non purifiées, la présence de vésicules d'origine gliale (GPV, pour « *glial glasmalemmal vesicles* » en anglais), dont la participation au processus de capture de glutamate a été évaluée, dans l'hippocampe, à environ 70 %. Enfin, Ginsberg et coll. (1995) ont révélé que la réduction du taux de capture de glutamate mesuré à partir de synaptosomes striataux bruts coïncide avec une altération lente et tardive de l'expression des ARN_m codant GLAST et GLT-1. Nos résultats corroborent donc cette notion de réduction lente et tardive de la capture striatale de glutamate à partir de préparations synaptosomales brutes, en réponse à une lésion du cortex ipsilatéral puisque, dans nos conditions expérimentales, elle n'apparaît que 8 jours après la déafférentation cortico-striatale.

L'impact de la lésion du cortex ipsilatéral sur la transmission glutamatergique est donc essentiellement perceptible au niveau des concentrations tissulaires de glutamate qui reflètent une distribution cellulaire (Meldrum, 2000), nettement en faveur des neurones (Fonnum, 1985). La baisse non significative des concentrations extracellulaires basales de glutamate peut être différemment interprétée (voir précédemment). En revanche, le maintien des capacités de capture synaptosomale de glutamate reflète très probablement une implication prépondérante des cellules gliales à cet égard.

4.1.1.3 EFFET DE LA LÉSION CORTICALE SUR LA TRANSMISSION DOPAMINERGIQUE STRIATALE

Deux jours après la lésion unilatérale du cortex, le contenu total en dopamine dans le striatum ipsilatéral est de $2,4 \pm 0,4$ nmol/mg de protéines vs. $2,5 \pm 0,3$ nmol/mg de protéines pour le striatum contralatéral ($F(1,18) = 0,106$; $p > 0,05$; $n = 10$; Table 9). De même les taux de DOPAC dans le striatum ne sont pas affectés par la lésion ($0,50 \pm 0,12$ nmol/mg de protéines

dans le striatum ipsilatéral vs. $0,42 \pm 0,09$ nmol/mg de protéines dans le striatum contralatéral ; $F(1,12) = 0,02$; $p > 0,05$; $n = 7$; Table 9).

La capture synaptosomale de [^3H]-dopamine mesurée sur des synaptosomes préparés à partir du striatum ipsilatéral ($82,6 \pm 25,2$ pmol/mg de protéines) ne diffère pas significativement de celle évaluée sur des synaptosomes isolés à partir du striatum contralatéral à la lésion ($61,2 \pm 14,7$ pmol/mg de protéines ; $F(1,18) = 2,581$; $p > 0,05$; $n = 10$), bien qu'une tendance à l'augmentation semble se dégager du côté ipsilatéral. De même, les concentrations basales de dopamine dans les dialysats collectés, à partir du striatum ipsilatéral, par microdialyse sont identiques pour les animaux lésés et les animaux témoins (respectivement $30,2 \pm 8,3$ fmol/min vs. $31,8 \pm 5,8$ fmol/min ; $t = 0,32$; $p > 0,05$; $n = 20$; Table 9).

Deux jours après la lésion du cortex, la capture de dopamine, mesurée sur des synaptosomes préparés à partir du striatum ipsilatéral, reste inchangée, indiquant le maintien de l'intégrité des terminaisons dopaminergiques striatales. En effet, la capture de dopamine est considérée comme un index fiable de l'innervation dopaminergique, car elle n'est pas altérée par l'administration chronique d'halopéridol et de bromocriptine, des composés affectant la transmission dopaminergique (Naudon et coll., 1995). Au contraire, les concentrations de dopamine dans le striatum peuvent être modifiées par de nombreux traitements pharmacologiques ou lésions. Dans certaines études, l'ablation du cortex provoque une altération des taux de dopamine (Boyeson & Feeney, 1985 ; Pasinetti et coll., 1991) mais elle n'est pas rapportée dans certaines autres études (Hassler et coll., 1982 ; Scatton et coll., 1982 ; Desole et coll., 1992). Plus précisément, Pasinetti et coll. (1991) ont observé, 10 jours après l'ablation du cortex ipsilatéral, mais pas 3 jours plus tard, une réduction de la concentration striatale de dopamine, d'une manière inversement proportionnelle à la concentration striatale en GFAP (en anglais : « *glial fibrillary acidic protein* »). Ils ont conclu que cette diminution du contenu en dopamine dans le striatum ipsilatéral pourrait refléter un remodelage neuronal

des terminaisons nigro-striatales résultant d'une réaction astrocytaire induite par la lésion des afférences cortico-striatales. Dans notre étude, le contenu striatal en dopamine et en DOPAC n'est pas altéré par la lésion, indiquant que, 2 jours après thermo-coagulation du cortex ipsilatéral, ces modifications ne sont pas encore perceptibles. De plus, 2 jours après la lésion corticale, les taux extracellulaires de dopamine dans le striatum ipsilatéral ne sont pas altérés alors que, 2 semaines plus tard, Smolders et coll. (1996) ont observé leur réduction. Comme la transmission glutamatergique stimule de manière tonique la libération striatale de dopamine (Westerink et coll., 1989b ; Wang, 1991), l'absence d'altération de la transmission dopaminergique striatale, 2 jours après déafférentation cortico-striatale, semble en accord avec le fait que, dans les mêmes conditions, nous n'ayons pas observé de modification significative des concentrations extracellulaires basales de glutamate. Par conséquent, le fait qu'aucun des index du système de transmission dopaminergique n'ait été altéré dans notre étude est un argument en faveur d'une préservation de l'intégrité fonctionnelle des afférences nigro-striatales, du moins en ce qui concerne la synthèse de dopamine, sa recapture et, probablement, leur capacité de libérer la dopamine en réponse au glutamate extracellulaire.

4.1.2 ÉVALUATION PAR MICRODIALYSE INTRA-STRIATALE DE L'EFFET D'UNE INFUSION DE DPDPE SUR LES CONCENTRATIONS BASALES DE DOPAMINE ET DE GLUTAMATE CHEZ DES ANIMAUX SOUMIS OU NON À UNE LÉSION DU CORTEX IPSILATÉRAL

L'effet d'une stimulation des récepteurs opioïdes de type δ par la DPDPE sur les libérations striatales de dopamine et de glutamate est évalué par microdialyse intracérébrale, technique adaptée et validée par les équipes d'Ungerstedt (Zetterstrom et coll., 1983) et de Di Chiara (Imperato & Di Chiara, 1984 ; Di Chiara, 1990). La microdialyse permet, à l'aide d'une sonde, équipée d'une membrane dialysante, directement implantée dans le tissu cérébral, de recueillir certaines substances présentes dans le milieu extracellulaire, parmi lesquelles divers

neurotransmetteurs. Le principal avantage de cette technique est sa capacité d'évaluer, dans les échantillons de dialyse, les concentrations de substances reflétant de manière dynamique leurs taux extracellulaires, sans autre perturbation de l'environnement cellulaire que l'introduction de la sonde dans le territoire d'intérêt. Les expériences sont, en outre, pratiquées chez l'animal éveillé, l'intégrité des fonctions neuronales étant parfaitement préservée. La microdialyse intracérébrale est ainsi devenue la technique de choix dans l'étude des concentrations extracellulaires des neurotransmetteurs et de leurs métabolites (Robinson & Justice, 1991). En revanche, pour représenter un index fiable du processus de neurotransmission, les concentrations des neurotransmetteurs évaluées, dans les conditions de base, à partir des dialysats doivent satisfaire à 2 critères : l'implication de canaux sodiques dépendants du voltage et la calcium-dépendance (Timmerman & Westerink, 1997). Le recrutement des canaux sodiques voltage-dépendants est habituellement testé par l'infusion locale de tétrodoxtine (TTX), un puissant inhibiteur de ces canaux ioniques, alors que la calcium-dépendance est généralement évaluée grâce à l'infusion d'un milieu dépourvu de cet ion. Dans un premier temps, nous avons donc déterminé les caractéristiques des taux de glutamate et de dopamine contenus dans les dialysats recueillis selon nos conditions expérimentales.

4.1.2.1 EFFETS DE L'INFUSION DE LA TTX ET D'UN MILIEU DÉPOURVU DE CALCIUM SUR LES CONCENTRATIONS EXTRACELLULAIRES BASALES DE DOPAMINE

Les concentrations de dopamine mesurées, dans les conditions de base, dans les dialysats sont stables dans les échantillons collectés avant l'ajout de la TTX dans le milieu de dialyse (Figure 31A ; 3 premiers dialysats collectés). L'infusion striatale de TTX (10 μ M) pendant 40 min provoque une diminution rapide et marquée des concentrations en dopamine des dialysats ($F(10,65) = 5,706$; $p < 0,001$; $n = 6$; Figure 31A). Une ANOVA à 1 facteur et à mesures

répétées révèle que cette infusion de TTX provoque, 20 min plus tard, une réduction significative des concentrations de dopamine (exprimées en % des taux de base) dans les échantillons collectés par microdialyse (- 78,8 % ; $p < 0,01$; $n = 6$). Cet effet perdure jusqu'à 60 min après l'arrêt du traitement par la TTX (- 79,9 % ; $p < 0,01$; $n = 6$). Les concentrations de dopamine dans les dialysats rejoignent des valeurs comparables aux valeurs initiales après 80-120 min (Figure 31A). De même, alors que les concentrations basales de dopamine sont stables dans les 3 échantillons précédant l'infusion d'un milieu dépourvu de calcium (Figure 31B ; 3 premiers dialysats collectés), la déplétion en calcium pendant une période de 40 min provoque une forte réduction des concentrations de dopamine (exprimées en % des taux de base) dans les dialysats ($F(10,65) = 1,909$; $p < 0,05$; $n = 6$; Figure 31B). Cette diminution perdure jusqu'à 60 min après l'arrêt du traitement par la TTX, temps auquel elle devient totale (- 100 % ; $p < 0,01$; $n = 6$). Les concentrations de dopamine dans les dialysats rejoignent des valeurs comparables à celles de la ligne de base après 80-120 min (Figure 31B).

Les expériences de microdialyse intracérébrale révèlent en général une forte dépendance des concentrations extracellulaires de dopamine à l'application de la TTX ou à une déplétion en calcium (Westerink et coll., 1987a ; Kemel et coll., 1989 ; Morari et coll., 1993 ; Feenstra & Botterblom, 1996). L'organisation de la synapse dopaminergique, clairement différente de celle de la synapse glutamatergique (Zoli & Agnati, 1996), permet en effet à la sonde utilisée dans les expériences de microdialyse d'avoir accès à une fraction de dopamine extracellulaire qui reflète sa libération synaptique. Les terminaisons dopaminergiques mésolimbiques forment généralement dans la région des intervaricosités (plus rarement au niveau des varicosités), des synapses « en passant » symétriques avec les dendrites des neurones épineux de taille moyenne du striatum (Freund et coll., 1984 ; Groves et coll., 1994). L'élément postsynaptique, localisé à environ 15 nm de l'élément présynaptique, porte des récepteurs dopaminergiques de type D_1 ou D_2 que l'on retrouve notamment concentrés au niveau de

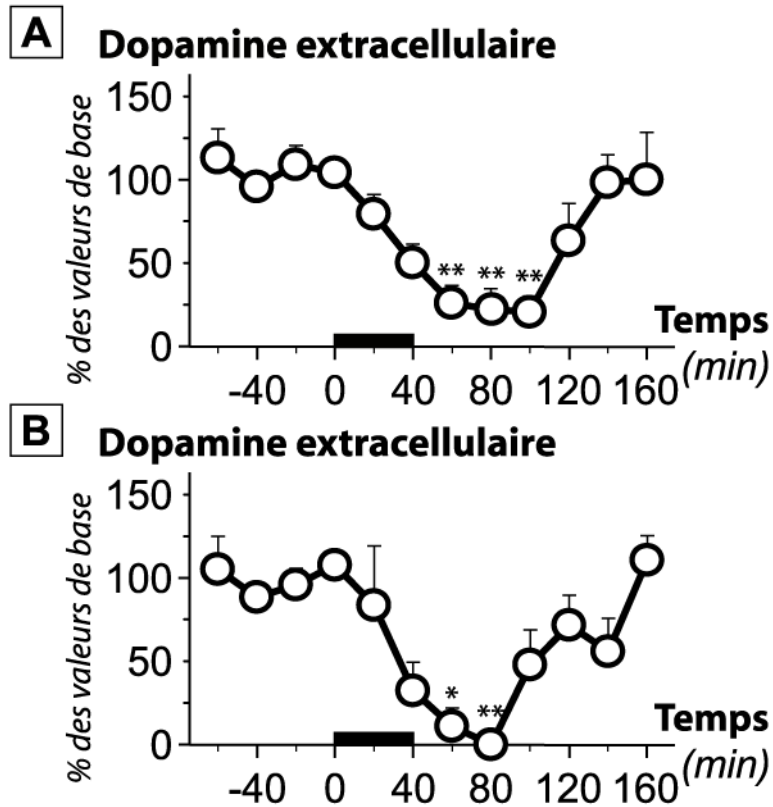


Figure 31 : Effet de la TTX et d'une déplétion en calcium sur les concentrations de dopamine mesurées dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux témoins.

Deux jours après l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, une sonde de microdialyse est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer au débit de 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Après une période d'équilibration de 2 heures, des échantillons successifs de 20 μL sont collectés et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en dopamine. Les 3 premiers dialysats, utilisés pour déterminer la libération basale de dopamine, sont suivis (A) par l'infusion de la TTX (10 μM) ou (B) d'un milieu dépourvu de calcium, pendant 40 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais). (A) La concentration basale de dopamine dans les dialysats, mesurée à partir des 3 premiers échantillons, est de $29,3 \pm 6,1$ fmol/min ($n = 6$). (B) La concentration basale de dopamine dans les dialysats, mesurée à partir des 3 premiers échantillons, est de $21,9 \pm 4,7$ fmol/min ($n = 6$). Les données sont exprimées en % de la concentration basale de dopamine dans les dialysats. Les moyennes \pm S.E.M. pour 6 rats par groupe sont comparées grâce à une ANOVA à 2 facteurs et à mesures répétées suivie par un test de Tukey. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ vs. libération basale.

portions dendritiques extra-synaptiques (Sesack et coll., 1994 ; Yung et coll., 1995). Les systèmes de dégradation enzymatique de la dopamine opérant de manière relativement lente (Michael et coll., 1985 ; Wightman & Zimmerman, 1990), sa clairance est principalement assurée par les sites de capture qui présentent la particularité de ne pas être condensés au niveau synaptique (Cerruti et coll., 1991 ; Nirenberg et coll., 1996). Ces caractéristiques morphologiques et fonctionnelles impliquent donc que, outre ses effets purement synaptiques,

la dopamine libérée par les terminaisons dopaminergiques peut diffuser dans le milieu environnant la sonde utilisée dans les expériences de microdialyse, dont le diamètre (0,24 mm) dépasse très largement les dimensions de l'espace synaptique (15 nm) dans lequel elle ne peut donc s'insérer. Nos résultats, similaires à ceux classiquement observés dans la littérature, attestent par conséquent de la fiabilité de nos expériences de microdialyse.

4.1.2.2 EFFETS DE L'INFUSION DE LA TTX ET D'UN MILIEU DÉPOURVU DE CALCIUM SUR LES CONCENTRATIONS EXTRACELLULAIRES BASALES DE GLUTAMATE

Les concentrations basales de glutamate dans les dialysats se sont révélées stables dans les échantillons collectés avant le traitement par la TTX (Figure 32A ; 3 premiers dialysats collectés). L'infusion striatale de la TTX (10 μ M), pendant 40 min, ne modifie pas significativement les concentrations de glutamate dans les dialysats (exprimées en % des taux de base) ($F(10,65) = 1,868$; $p > 0,05$; $n = 6$; Figure 32A). De même, alors que les concentrations basales de glutamate sont stables dans les 3 échantillons précédant l'infusion d'un milieu dépourvu de calcium (Figure 32B ; 3 premiers dialysats collectés), la déplétion en calcium sur une période de 40 min ne provoque pas de variation significative par rapport aux valeurs de base ($F(10,65) = 1,909$; $p > 0,05$; $n = 6$; Figure 32B). Ces résultats indiquent que, dans nos conditions expérimentales, les concentrations basales de glutamate dans les échantillons recueillis par microdialyse ne dépendent ni de l'ouverture de canaux ioniques perméables au sodium ni de la disponibilité en calcium ; deux critères classiquement utilisés pour témoigner de la libération exocytotique d'un neurotransmetteur.

Le glutamate est considéré comme le principal neurotransmetteur du cerveau des mammifères et sa libération synaptique sous l'effet d'une dépolarisation neuronale et selon un processus d'exocytose calcium-dépendant est par ailleurs démontrée (*pour revue* : Hertz, 2006).

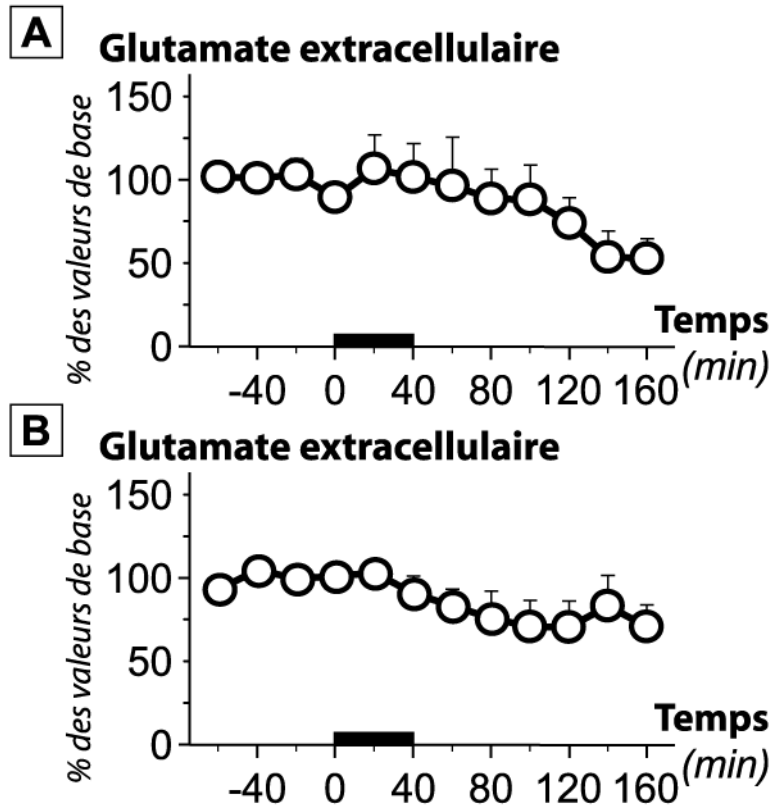


Figure 32 : Effet de la TTX et d'une déplétion en calcium sur les concentrations de glutamate mesurées dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux témoins.

Deux jours après l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, une sonde de microdialyse est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer au débit de 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Après une période d'équilibration de 2 heures, des échantillons successifs de 20 μL sont collectés et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en glutamate. Les 3 premiers dialysats, utilisés pour déterminer la libération basale de glutamate, sont suivis (A) par l'infusion de la TTX (10 μM) ou (B) d'un milieu dépourvu de calcium, pendant 40 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais). (A) La concentration basale de glutamate dans les dialysats, mesurée à partir des 3 premiers échantillons, est de $17,5 \pm 2,8$ pmol/min ($n = 6$). (B) La concentration basale de glutamate dans les dialysats, mesurée à partir des 3 premiers échantillons, est de $16,2 \pm 3,1$ pmol/min ($n = 6$). Les données sont exprimées en % de la concentration basale de glutamate dans les dialysats. Les moyennes \pm S.E.M. pour 6 rats par groupe sont comparées grâce à une ANOVA à 2 facteurs et à mesures répétées suivie par un test de Tukey.

Néanmoins, les expériences de microdialyse intracérébrale *in vivo*, technique la plus fréquemment utilisée pour l'analyse du fluide extracellulaire, produisent des résultats qui sont fréquemment en contradiction avec cette notion de libération exocytotique de glutamate, incitant de nombreux auteurs à émettre des doutes sur l'origine du glutamate présent dans les dialysats (Ungerstedt, 1984 ; Westerink et coll., 1987b ; Herrera-Marschitz et coll., 1996 ; Timmerman & Westerink, 1997 ; Del Arco et coll., 2003). En effet, les concentrations de

glutamate dans les dialysats présentent en général une indifférence vis-à-vis d'une déplétion en calcium (Westerink et coll., 1989a ; Lawrence & Jarrott, 1994 ; You et coll., 1994) ainsi qu'une absence de sensibilité à la TTX (Westerink et coll., 1987b ; Glass et coll., 1993 ; Moghaddam, 1993 ; Hashimoto et coll., 1995). Bien que plus rares, certaines études ont néanmoins indiqué une dépendance partielle au calcium et à la TTX (*pour revues* : Timmerman & Westerink, 1997 ; Drew et coll., 2004). En outre, il a récemment été mis en évidence que la sensibilité des taux extracellulaires de glutamate à la TTX peut être révélé *in vivo* grâce à la technique des microsenseurs (Oldenziel et coll., 2006) utilisant des microélectrodes couvertes d'un revêtement enzymatique, la L-glutamate oxydase, qui permet d'augmenter la sélectivité de la détection et d'accéder à une meilleure résolution temporelle et spatiale. Nos données suggèrent, par conséquent, que les échantillons de microdialyse sont le reflet d'une fraction extracellulaire où le glutamate résultant d'une libération neuronale est largement masqué par un apport d'origine non neuronale. L'architecture très cloisonnée de la synapse glutamatergique, étroitement enserrée dans un fourreau glial, conforte cette idée en rendant peu probable que le glutamate libéré dans l'espace synaptique puisse diffuser dans le compartiment extracellulaire environnant la sonde de dialyse (Clements et coll., 1992 ; Pfrieder & Barres, 1996 ; Diamond & Jahr, 2000). Les cellules gliales, dont il apparaît de plus en plus évident qu'elles entretiennent des relations très étroites avec les neurones, dans le cadre de la transmission du signal glutamatergique notamment (*pour revue* : Volterra & Meldolesi, 2005), s'imposent ainsi comme des candidates de prédilection au rôle de source non neuronale de glutamate. En effet, il est désormais démontré que ces cellules sont capables de relayer le signal glutamatergique, tant en ce qui concerne sa réception que son émission (*pour revue* : Volterra & Meldolesi, 2005 ; *cf.* partie suivante). Ainsi, de nombreuses études ont démontré que les cellules gliales sont capables de libérer du glutamate dans le compartiment extracellulaire selon, dans l'ordre chronologique de leur découverte, divers

processus (*pour revue* : Malarkey & Parpura, 2007) : (1) une inversion de capture au niveau des transporteurs du glutamate ; (2) une ouverture de canaux ioniques induite par un gonflement cellulaire ; (3) une libération associée à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$; (4) un efflux via l'échangeur cystine/glutamate ; (5) une diffusion par l'intermédiaire de récepteurs purinergiques ionotropiques ; (6) une libération via des « héli-canaux » correspondant à des « demi-jonction GAP » sans vis-à-vis. Bien que le mécanisme de capture inversée ait été initialement proposé comme principale source non neuronale de glutamate alimentant le compartiment extracellulaire (Timmerman & Westerink, 1997), Baker et coll. (2002) ont récemment montré que, dans le striatum, l'intervention de l'échangeur cystine/glutamate pourrait être prépondérante dans ce processus. Néanmoins, l'élévation des taux de calcium à l'intérieur des cellules gliales semble être considérée comme un élément clé de la signalisation intercellulaire entre neurones et astrocytes, notamment en ce qui concerne la libération non neuronale de glutamate (Del Arco et coll., 2003 ; Fellin & Carmignoto, 2004 ; Di Garbo et coll., 2007).

4.1.2.3 EFFET D'UNE INFUSION STRIATALE DE DPDPE SUR LA CONCENTRATION DE DOPAMINE DANS LES DIALYSATS OBTENUS PAR MICRODIALYSE À PARTIR DU STRIATUM D'ANIMAUX SOUMIS OU NON À UNE LÉSION DU CORTEX IPSILATÉRAL

Les résultats des expériences précédentes indiquent que, dans nos conditions expérimentales, les concentrations extracellulaires de dopamine mesurées, dans les conditions de base, dans le striatum ipsilatéral respectent les critères de libération voltage- et calcium-dépendante. En outre, nous avons également mis en évidence que les principaux index neurochimiques associés à la transmission dopaminergique sont préservés dans le striatum d'animaux ayant subi une lésion du cortex ipsilatéral. Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet d'une infusion striatale de DPDPE sur les taux extracellulaires de dopamine.

Les concentrations de dopamine dans les dialysats collectés dans les conditions de base par microdialyse sont stables dans chaque groupe avant le traitement par la DPDPE (Figure 33 ; 3 premiers échantillons collectés). L'infusion striatale de DPDPE (10 μ M) provoque, 20 min plus tard, une augmentation significative des concentrations de dopamine (exprimées en % des taux de base de dopamine) dans les dialysats (+ 59,0 % ; $p < 0,001$; $n = 10$). Les concentrations de dopamine dans les dialysats rejoignent, chez les animaux témoins, les valeurs de la ligne de base après 40-60 min. La lésion du cortex cérébral par thermo-coagulation provoque, dans le striatum ipsilatéral, une abolition de cet effet stimulant induit par la DPDPE sur la libération de dopamine.

L'ANOVA à 3 facteurs, réalisée à partir des données exprimées en %, avec [la décortication], [le traitement par la DPDPE] et [le temps] comme facteurs, indique une interaction [décortication] x [traitement DPDPE] ($F(1,252) = 5,55$; $p = 0,019$). Plus précisément, une ANOVA à 2 facteurs et à mesures répétées, effectuée à partir des valeurs relatives aux animaux lésés et non lésés, révèle que l'infusion de DPDPE (10 μ M), pendant 20 min, provoque, chez les animaux non lésés, une augmentation significative des concentrations de dopamine dans les deux dialysats collectés après le début du traitement (interaction [traitement DPDPE] x [temps] ; $F(6,108) = 6,62$; $p = 0,021$) alors qu'elle est sans effet chez les animaux ayant subi une lésion du cortex ipsilatéral ([traitement DPDPE] x [temps] ; $F(6,108) = 0,45$; $p > 0,05$).

Une ANOVA à deux facteurs est effectuée à partir des valeurs cumulées. De manière à accorder cette analyse avec celle effectuée dans les mêmes conditions pour le glutamate (*cf.* chapitre suivant), nous avons dans le cas présent cumulé les aires sous la courbe des 3 échantillons suivant le début du traitement par la DPDPE. Cette analyse confirme que l'interaction entre les facteurs [décortication] et [traitement DPDPE] est significative ($F(1,36) = 4,065$; $p = 0,039$), tout comme l'augmentation des concentrations de dopamine induite par

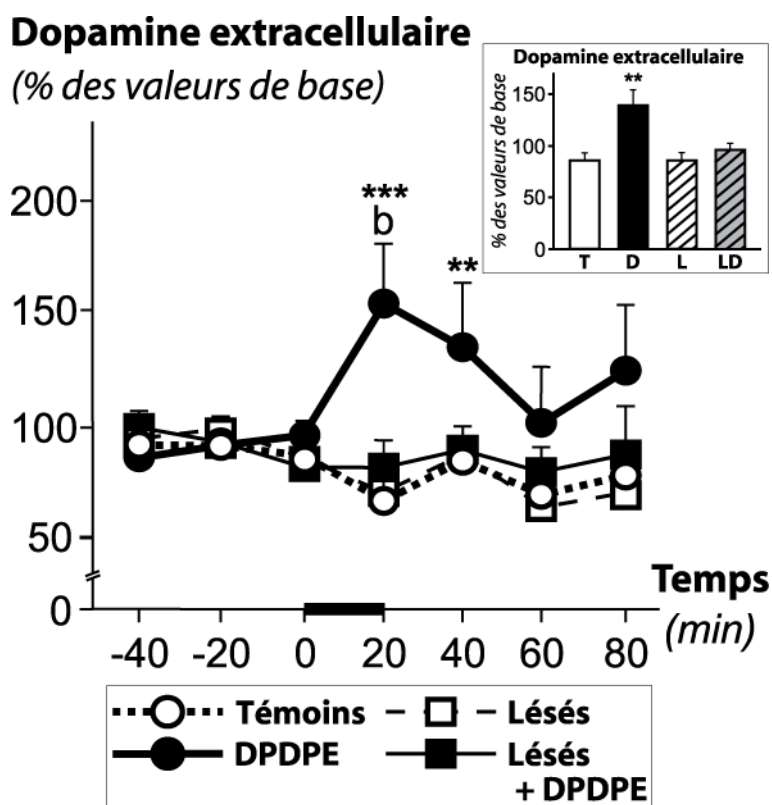


Figure 33 : Effet de la DPDPE sur les concentrations de dopamine mesurées dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis ou non à une thermo-coagulation du cortex.

Avant l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, les animaux sont soumis ou non à une lésion du cortex ipsilatéral par thermo-coagulation ($I = 15 \text{ V}$; $t = 50 \text{ s}$). Deux jours plus tard, une sonde de microdialyse est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer au débit de $1,0 \mu\text{L}/\text{min}$. Après une période d'équilibration de 2 heures, des échantillons successifs de $20 \mu\text{L}$ sont collectés et analysés par HPLC dans le but d'évaluer leur contenu en dopamine. Les 3 premiers échantillons, utilisés pour déterminer la libération basale de dopamine, sont suivis par l'infusion de dopamine ($10 \mu\text{M}$) pendant 20 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais). La concentration basale de dopamine des dialysats, mesurée au cours de la collecte des 3 premiers échantillons, est de $31,8 \pm 5,8 \text{ fmol}/\text{min}$ chez les animaux témoins ($n = 20$) vs. $30,2 \pm 8,3 \text{ fmol}/\text{min}$ pour les animaux lésés ($n = 20$). Les données sont exprimées en % de la concentration basale de dopamine des dialysats. Les moyennes \pm S.E.M. de 10 rats par groupe sont comparées au moyen d'une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ vs. groupe témoin ; (b) $P < 0,01$ vs. groupe d'animaux lésés et traités à la DPDPE. L'insert illustre la libération moyenne de dopamine évaluée au cours des 60 min suivant le début du traitement chez les animaux témoins (T) et lésés (L) ainsi que chez les animaux témoins (D) et lésés (LD) soumis à l'infusion intra-striatale de DPDPE. ** $P < 0,01$; $n = 10$.

la DPDPE (+ 37,3 % ; $p < 0,01$; $n = 10$; insert de la Figure 33), indiquant que la stimulation exercée par la DPDPE sur les taux extracellulaires de dopamine est prévenue par la lésion du cortex ipsilatéral.

La modulation des taux extracellulaires de dopamine induite par la stimulation des récepteurs opioïdes δ a été largement étudiée. Il a, en outre, été mis en évidence que la DPDPE ne

possède aucun effet propre sur les capacités de capture de dopamine évaluées à partir de synaptosomes striataux, indiquant ainsi que son influence sur les concentrations extracellulaires de dopamine procède probablement d'une libération de dopamine (Das et coll., 1994). De nombreuses études ont rapporté une stimulation de la libération de dopamine par les agonistes δ , au moyen de diverses techniques expérimentales : *in vitro* à partir de coupes superfusées (Lubetzki et coll., 1982 ; Petit et coll., 1986) ou *in vivo* grâce aux techniques de « push pull cannula » (Chesselet et coll., 1981), de microdialyse (Dourmap et coll., 1990, 1992) ou de voltamétrie (Pentney & Gratton, 1991). En accord avec ces études, nos résultats indiquent que la DPDPE augmente de manière significative la libération de dopamine dans le striatum d'animaux non lésés. Schad et coll. (1996) ont montré, dans le striatum, que le naltrindole, un antagoniste des récepteurs δ , réduit la libération de dopamine induite par l'amphétamine mais ne possède pas d'effet propre sur la libération basale de dopamine. Ces résultats confirment l'influence des récepteurs opioïdes de type δ sur les taux extracellulaires de dopamine, tandis que l'absence d'effet intrinsèque du naltrindole pourrait suggérer une modulation phasique des enképhalines sur la libération de dopamine. Cependant, des travaux précédemment menés dans notre laboratoire ont indiqué que le kétorphan, un inhibiteur des enzymes de dégradation des enképhalines, induit une augmentation des concentrations extracellulaires de dopamine (Dourmap et coll., 1990), suggérant au contraire un contrôle tonique des enképhalines sur la libération de dopamine. En ce qui concerne les méthodes *in vitro*, Lubetzki et coll. (1982) et Petit et coll. (1986) ont mis en évidence une augmentation de la libération de dopamine à partir de coupes striatales après application d'agonistes des récepteurs δ . À l'opposé, certaines études, effectuées à partir de coupes striatales, n'ont révélé aucune modification de la libération de [3 H]-dopamine, soit dans les conditions basales (Mulder et coll., 1984 ; De Vries et coll., 1989), soit sous l'influence d'une stimulation électrique (Schoffemeer et coll., 1988) ou sous celle d'une élévation des

concentrations de potassium (Werling et coll., 1988). De plus, Jhamandas & Marien (1987) ont indiqué que la [D-Ala², D-Leu]-enképhaline (DADLE), un autre agoniste δ -opioïde, réduit, à partir de coupes striatales, la libération de dopamine induite par le glutamate ; et ce d'une manière sensible à la naloxone, un antagoniste non sélectif des récepteurs opioïdes (Reisine, 1995). Ces divers résultats indiquent que la modulation positive exercée par les récepteurs opioïdes de type δ sur les taux extracellulaires de dopamine est plus aisément observable dans les expériences menées *in vivo* que dans celles effectuées *in vitro*. Ceci suggère que l'intégrité des connexions neuronales du striatum doit être préservée et que, par conséquent, cet effet résulte probablement d'un mécanisme indirect. Cependant, le fait que les expériences *in vitro* aient été menées sur la libération de dopamine dans des conditions basales ou évoquées pourrait également participer à ces discordances.

La lésion du cortex ipsilatéral prévient l'augmentation, induite par la DPDPE, de la concentration de dopamine dans les dialysats. Ces données suggèrent que l'effet stimulant induit par la DPDPE sur la libération striatale de dopamine requiert la présence de terminaisons cortico-striatales pleinement fonctionnelles et qu'il pourrait donc mettre en jeu une libération préalable de glutamate. Cette hypothèse paraît, en outre, cohérente avec les résultats, précédemment obtenus dans notre laboratoire, démontrant que l'augmentation des taux extracellulaires de dopamine induite par la DPDPE est abolie par un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (Dourmap & Costentin, 1994). Elle s'oppose cependant aux données indiquant que la lésion des afférences nigro-striatales induite par la 6-OHDA provoque une diminution de l'expression striatale des récepteurs δ (Trovero et coll., 1990), qui suggère une localisation présynaptique de ces récepteurs au niveau des terminaisons dopaminergiques. Cette notion est, en revanche, moins communément admise que celle d'une distribution prédominante des récepteurs δ au niveau des interneurones cholinergiques striataux (Le Moine et coll., 1994 ; Mansour et coll., 1994). Néanmoins,

d'autres travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que l'effet stimulant induit par la DPDPE sur la libération striatale de dopamine est indépendant d'une lésion des neurones striataux opérée par l'acide kaïnique (Dourmap et coll., 1994). Lubetzi et coll. (1982) ont, par ailleurs, indiqué que cet effet est également indépendant de l'administration de la TTX et ont interprété ce résultat comme le reflet probable d'un effet présynaptique direct procédant de la stimulation des récepteurs opioïdes δ sur la libération striatale de dopamine. Cette interprétation est toutefois incomplète car un effet indépendant de la conduction d'un influx nerveux pourrait également résulter d'un mécanisme présynaptique indirect. Les terminaisons des neurones glutamatergiques originaires du cortex cérébral sont d'excellentes candidates à ce poste. En effet, le contrôle présynaptique exercé par la transmission glutamatergique sur la libération striatale de dopamine, par l'intermédiaire de récepteurs glutamatergiques localisés au niveau des terminaisons nigro-striatales, est largement documenté (Westerink et coll., 1989b ; Moghaddam et coll., 1990 ; Wang, 1991), tout comme l'implication des neurones cortico-striataux dans cet effet (Nieoullon et coll., 1978 ; Smolders et coll., 1996).

4.1.2.4 EFFET D'UNE INFUSION STRIATALE DE DPDPE SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE DANS LES DIALYSATS OBTENUS PAR MICRODIALYSE À PARTIR DU STRIATUM D'ANIMAUX SOUMIS OU NON À UNE LÉSION DU CORTEX IPSILATÉRAL

Nos expériences précédentes laissant supposer une implication de la transmission glutamatergique cortico-striatale dans l'augmentation de la libération de dopamine induite par la DPDPE, nous avons donc entrepris de mettre à l'épreuve cette hypothèse. Pour ce faire, nous avons recherché un effet éventuel des récepteurs δ sur les taux extracellulaires de glutamate grâce à la DPDPE et au naltrindole, un antagoniste de ces récepteurs. Nous avons également étudié les effets de la DPDPE sur les taux extracellulaires de glutamate chez des animaux préalablement soumis à une lésion du cortex ipsilatéral.

Les concentrations basales de glutamate dans les dialysats se sont révélées stables pour chaque groupe dans les échantillons collectés avant l'infusion striatale de DPDPE (Figure 34 ; 3 premiers dialysats collectés). L'infusion de DPDPE (10 μ M) dans le striatum de rats non lésés provoque, 20 min plus tard, une augmentation du taux de glutamate dans les dialysats de 34,2 % (exprimé en % du taux basal de glutamate), de manière significative ($p < 0,01$; $n = 10$). La concentration en glutamate dans les dialysats rejoint les taux de base après 60-80 min (Figure 34). De plus, l'ajout de naltrindole (10 μ M) au milieu de perfusion inhibe totalement les effets stimulants de la DPDPE sur les concentrations de glutamate mesurées dans les dialysats (interaction [traitement DPDPE] x [temps] ; $F(8,143) = 0,690$; $p > 0,05$; $n = 8$) ; le naltrindole n'ayant aucun effet propre sur les taux de glutamate dans les échantillons de microdialyse (interaction [traitement naltrindole] x [temps] ; $F(8,143) = 0,923$; $p > 0,05$; $n = 8$; Figure 35). De même, l'augmentation des taux de glutamate dans les dialysats striataux est totalement prévenue par la thermo-coagulation du cortex ipsilatéral (Figure 34). Une ANOVA à 3 facteurs, réalisée à partir des valeurs relatives exprimées en %, avec [la décortication], [le traitement par la DPDPE] et [le temps] comme facteurs, démontre une interaction entre [le traitement DPDPE] et [le temps] ($F(6,252) = 2,62$; $p = 0,018$) et une interaction entre [la décortication] x [le temps] ($F(1,252) = 5,21$; $p = 0,023$). Plus précisément, une ANOVA à 2 facteurs et à mesures répétées, effectuée à partir des données concernant les animaux lésés et non lésés, révèle que l'infusion de DPDPE (10 μ M) pendant 20 min produit, chez les animaux non lésés, une augmentation significative du taux de glutamate (interaction [traitement DPDPE] x [temps] ; $F(6,108) = 2,57$; $p = 0,023$) dans les 3 échantillons collectés après le début du traitement alors qu'elle est sans effet dans le striatum d'animaux préalablement soumis à une destruction du cortex ipsilatéral (interaction [traitement DPDPE] x [temps] ; $F(6,108) = 2,05$; $p > 0,05$).

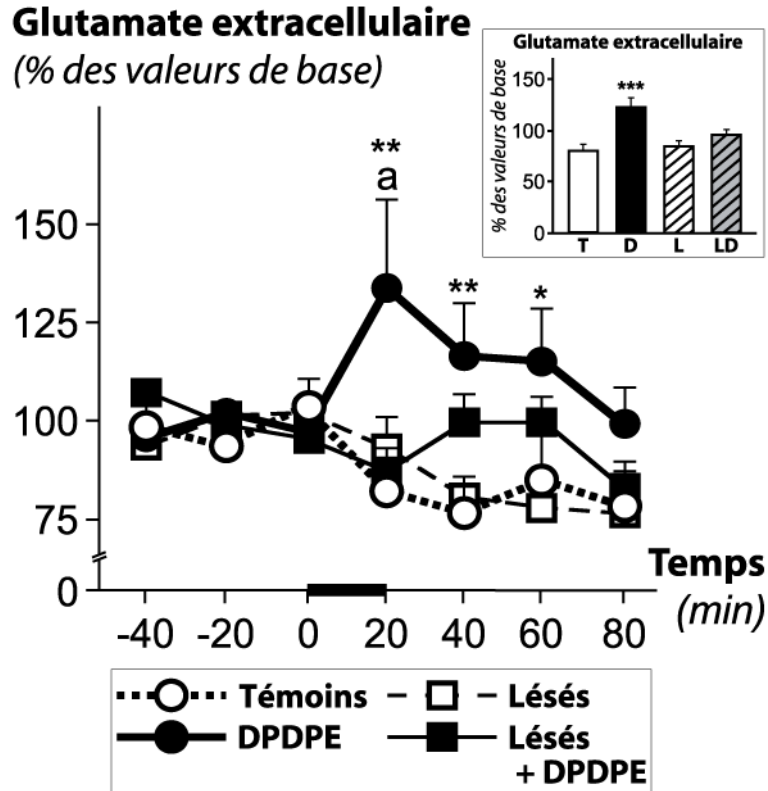


Figure 34 : Effet de la DPDPE sur les concentrations de glutamate mesurées dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis ou non à une thermo-coagulation du cortex ipsilatéral.

Avant l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, les animaux sont soumis ou non à la thermo-coagulation du cortex ipsilatéral ($I = 15 \text{ V}$, $t = 50 \text{ s}$). Deux jours plus tard, une sonde de microdialyse est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer au débit de $1,0 \mu\text{L}/\text{min}$. Après une période d'équilibration de 2 heures, des échantillons successifs de $20 \mu\text{L}$ sont collectés et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en glutamate. Les 3 premiers dialysats, utilisés pour déterminer la libération basale de glutamate, sont suivis par l'infusion de DPDPE ($10 \mu\text{M}$) pendant 20 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais). La concentration basale de glutamate dans les dialysats, mesurée à partir des 3 premiers échantillons, est de $22,6 \pm 3,6 \text{ pmol}/\text{min}$ chez les rats témoins ($n = 20$) vs. $15,8 \pm 3,5 \text{ pmol}/\text{min}$ chez les animaux lésés ($n = 20$). Les données sont exprimées en % de la concentration basale de glutamate dans les dialysats. Les moyennes \pm S.E.M. pour 10 rats par groupe sont comparées grâce à une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ vs. groupe témoin ; (a) $P < 0,05$ vs. groupe d'animaux lésés et traités à la DPDPE. L'insert montre la libération moyenne de glutamate évaluée au cours des 60 min suivant le début du traitement chez les animaux témoins (T) et lésés (L) ainsi que chez les animaux témoins (D) et lésés (LD) traités à la DPDPE. *** $P < 0,001$; $n = 10$.

Une ANOVA à deux facteurs, effectuée à partir des valeurs cumulées (aires sous la courbe pour les 3 échantillons collectés après le début du traitement par la DPDPE) indique que l'interaction entre [la décortication] et [le traitement DPDPE] est significative ($F(1,36) = 4,25$; $p = 0,047$), de même que l'augmentation des taux de glutamate induite par la DPDPE (+ 22,7 % ; $p < 0,001$; $n = 10$; insert de la Figure 34).

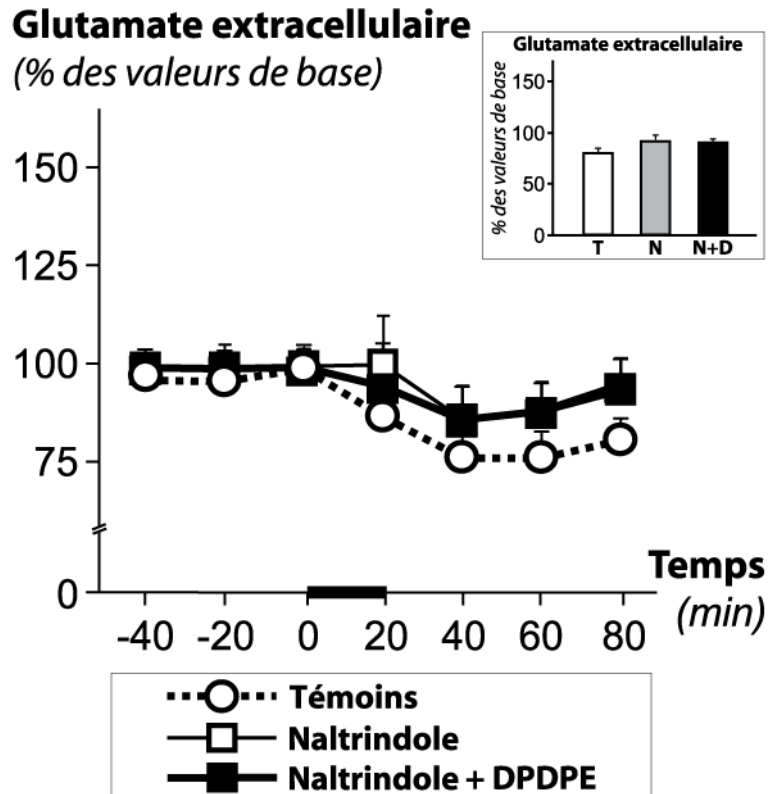


Figure 35 : Effet du naltrindole sur les concentrations de glutamate mesurées dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux témoins soumis ou non à une infusion de DPDPE.

Deux jours après l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, une sonde de microdialyse est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer au débit de 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Après une période d'équilibration de 2 heures, des échantillons successifs de 20 μL sont collectés et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en glutamate. Les 3 premiers dialysats, utilisés pour déterminer la libération basale de glutamate, sont suivis par l'infusion de naltrindole (10 μM) seul ou en présence de DPDPE (10 μM) pendant 20 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais). La concentration basale de glutamate dans les dialysats, mesurée à partir des 3 premiers échantillons, est de $19,7 \pm 3,6$ pmol/min ($n = 24$). Les données sont exprimées en % de la concentration basale de glutamate dans les dialysats. Les moyennes \pm S.E.M. pour 8 rats par groupe sont comparées grâce à une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. L'insert illustre la libération moyenne de glutamate évaluée au cours des 60 min suivant le début du traitement chez les animaux témoins (T) et traités au naltrindole seul (N) ou en présence de DPDPE (N+D).

Ces résultats montrent que la DPDPE, un agoniste sélectif des récepteurs opioïdes de type δ (Mosberg et coll., 1983), à la concentration de 10 μM communément utilisée dans les expériences de microdialyse (Dourmap et coll., 1991 ; Matsumoto et coll., 1994), augmente les taux extracellulaires de glutamate dans le striatum. La prévention de cet effet par le naltrindole (10 μM), un antagoniste sélectif des récepteurs opioïdes de type δ (Portoghese et

coll., 1988), indique l'implication spécifique des récepteurs opioïdes δ dans l'augmentation des taux extracellulaires de glutamate induite dans le striatum par la DPDPE.

L'effet des enképhalines sur la libération de glutamate a été très peu étudié. Arneric et coll. (1986) ont démontré que la Met-enképhaline induit la libération de glutamate à partir de coupes striatales, mais celle-ci présente une sélectivité relativement faible pour les récepteurs opioïdes de type δ (Mansour et coll., 1994). À notre connaissance, les résultats de la présente étude sont les premiers à démontrer une implication sélective des récepteurs opioïdes δ dans la libération striatale de glutamate. L'effet stimulant de la DPDPE sur les taux extracellulaires de glutamate pourrait apparaître en désaccord avec les modulations négatives exercées, de manière présynaptique ou postsynaptique, par les récepteurs δ sur la transmission glutamatergique. Ainsi, une inhibition présynaptique résultant de la stimulation des récepteurs δ a, par exemple, été mise en évidence sur la libération de glutamate induite par la capsaïcine à partir de coupes de moelle épinière (Ueda et coll., 1995). En outre, il a également été démontré que des agonistes de ces récepteurs inhibent les réponses postsynaptiques excitatrices induites par le glutamate, à partir de coupes cérébrales superfusées (Jiang & North, 1992 ; Ostermeier et coll., 2000) ou de cultures primaires de neurones (Vlaskovska et coll., 1997). Néanmoins, nos résultats corroborent ceux de Rawls & McGinty (2000) qui, grâce au naltrindole, ont révélé l'implication des récepteurs opioïdes δ dans la libération de glutamate induite par l'amphétamine. De plus, la prévention totale par la lésion du cortex ipsilatéral de l'augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate induite par l'infusion striatale de DPDPE montre que la présence des neurones glutamatergiques cortico-striataux est nécessaire au développement de cet effet. En outre, comme l'indiquent nos expériences précédentes, la lésion corticale abolit également les effets de la DPDPE sur la libération striatale de dopamine. Ces résultats sont donc cohérents avec ceux indiquant que la modulation positive exercée par la DPDPE sur la libération striatale de dopamine est

prévenue par un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (Dourmap et coll., 1994). Conjointement, ces données suggèrent que la libération de dopamine induite par la stimulation des récepteurs opioïdes de type δ pourrait être la conséquence d'une libération de glutamate à partir des terminaisons des neurones cortico-striataux.

4.1.3 EFFET DE LA LÉSION CORTICALE SUR LA LIAISON DE [³H]-DPDPE À UNE SUSPENSION DE MEMBRANES PRÉPARÉE À PARTIR DU STRIATUM IPSILATÉRAL

Nos expériences de microdialyse intra-striatale indiquent que les taux extracellulaires de glutamate sont augmentés en réponse à une stimulation des récepteurs opioïdes δ . En revanche, cet effet est totalement prévenu par une lésion du cortex ipsilatéral. Ce résultat nous a incités à rechercher l'influence d'une telle lésion sur la densité des sites de liaison de la [³H]-DPDPE dans le striatum. Dans un premier temps, nous avons étudié les paramètres cinétiques de cette liaison au moyen d'une analyse de Scatchard.

L'analyse Scatchard de la liaison de [³H]-DPDPE à des préparations membranaires purifiées à partir du striatum d'animaux témoins, en présence d'une gamme de concentrations de [³H]-DPDPE (de 0,5 à 30 nM), révèle l'existence d'un seul site de liaison présentant un K_D de $3,1 \pm 0,4$ nM et une valeur de B_{max} de $493,0 \pm 19,4$ pmol/mg de protéines ($n = 3$ expériences, Figure 36).

La liaison de la [³H]-DPDPE a ensuite été évaluée à la concentration de 4 nM, sur une préparation de membranes isolées à partir du striatum entier, deux jours après la lésion par thermo-coagulation du cortex ipsilatéral. Chez les animaux témoins, aucune différence au niveau de la liaison spécifique de [³H]-DPDPE n'est observée entre les deux hémisphères ($70,7 \pm 5,0$ fmol/mg de protéines dans le striatum ipsilatéral vs. $65,1 \pm 6,1$ fmol/mg de protéines dans le striatum contralatéral ; $F(1,10) = 2,371$; $p > 0,05$; $n = 11$). La lésion

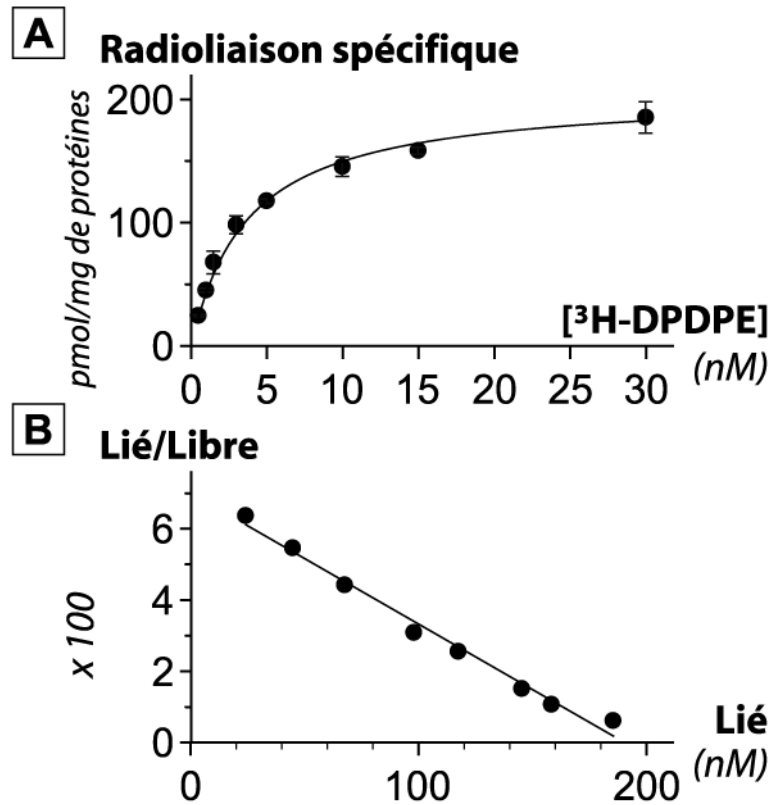


Figure 36 : Caractérisation de la radioliation de [³H]-DPDPE à des préparations synaptosomales obtenues à partir du striatum.

La radioliation de [³H]-DPDPE est évaluée à partir de synaptosomes striataux placés à incuber en présence de concentrations croissantes de radioligand (de 0,5 à 30 nM). À l'issue de l'incubation, les échantillons sont filtrés par aspiration sous vide et la radioactivité est mesurée sur les filtres par la technique de scintillation liquide. (A) Expériences de saturation (n = 3 expériences). (B) Représentation de Scatchard. Le tracé révèle l'existence d'un seul site de liaison présentant un K_D de $3,1 \pm 0,4$ nM et une valeur de B_{max} de $493,0 \pm 19,4$ pmol/mg de protéines (n = 3 expériences).

corticale, produite par thermo-coagulation, réduit significativement la liaison spécifique à des homogénats membranaires préparés à partir du striatum ipsilatéral par rapport au côté opposé (respectivement $58,1 \pm 6,8$ fmol/mg vs. $71,3 \pm 6,5$ fmol/mg ; - 18,5 % ; $F(1,10) = 11,229$; $p = 0,007$; n = 11).

Bien que la thermo-coagulation du cortex diminue la liaison striatale de DPDPE tritiée, certaines études recourant à la technique d'autoradiographie n'ont révélé, 3 semaines après ablation du cortex, aucune altération de la densité de liaison du [³H]-DTLET ou de la [³H]-Met-enképhaline dans le striatum (Waksman et coll., 1987 ; Warenycia et coll., 1987). La moins bonne sélectivité de ces ligands pour les récepteurs opioïdes δ , puisqu'ils peuvent

également se lier aux récepteurs de type μ (Meucci et coll., 1989 ; Dhawan et coll., 1996), et l'important délai entre l'ablation corticale et les expériences autoradiographiques expliquent probablement cette divergence.

La diminution du nombre de récepteurs opioïdes δ striataux observée, dans la présente étude, 2 jours après la lésion du cortex ipsilatéral, suggère que les terminaisons des neurones cortico-striataux pourraient exprimer ces récepteurs. Néanmoins, la majorité de ces récepteurs est localisée, dans le striatum, au niveau des interneurones cholinergiques (Mansour et coll., 1994 ; Le Moine et coll., 1994). Cependant, Wang & Pickel (2001) ont mis en évidence, au niveau des striosomes, la présence de récepteurs δ portés par les terminaisons axonales formant des synapses asymétriques avec les épines dendritiques des neurones épineux de taille moyenne, caractéristique des terminaisons glutamatergiques. De plus, Jose et coll. (2007) ont montré très récemment grâce à une méthode électrophysiologique que la DPDPE apparaît capable d'exercer une action présynaptique directe au niveau des terminaisons cortico-striatales. Ces résultats confirment nos propres observations et, de concert, ces données indiquent que des récepteurs δ sont localisés au niveau des terminaisons glutamatergiques cortico-striatales et pourraient ainsi directement moduler la libération de glutamate. Cette hypothèse s'oppose cependant au concept largement répandu selon lequel les substances opioïdes exerceraient la majorité de leurs effets, analgésiques notamment, en déprimant les systèmes de neurotransmission (Yaksh, 1997). Les récepteurs opioïdes δ , appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Evans et coll., 1992 ; Raynor et coll., 1994), sont en effet généralement associés à des protéines de types G_i ou G_o (Jeong & Ikeda, 1998) dont les sous-unités G_α sont négativement couplées à l'adénylyl cyclase (*pour revue* : Quock et coll., 1999). Les études menées sur les sous-unités $G_{\beta\gamma}$ révèlent que celles-ci inhibent les canaux calciques voltage-dépendants (Herlitze et coll., 1996 ; Ikeda, 1996) et augmentent la conductance au potassium (Logothetis et coll., 1987 ; Clapham & Neer, 1997). Une influence

directe des récepteurs δ sur les canaux K^+ a d'ailleurs été confirmée très récemment au niveau des terminaisons cortico-striatales (Jose et coll., 2007). Cependant, il a également été montré que les récepteurs δ -opioïdes peuvent être couplés à des voies de signalisation activatrices comme celle des MAP-kinases (Fukuda et coll., 1996 ; Li & Chang, 1996) ou de la phospholipase de type C (PLC) (Tsu et coll., 1995 ; Miyamae et coll., 1993). Si l'implication précise des MAP-kinases dans ce processus de transduction reste assez méconnue, il est en revanche admis, suivant le modèle classique, que l'activation de la PLC par les récepteurs δ stimule la production d'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) et de diacylglycérol (DAG). Ces derniers provoquent respectivement la libération de calcium à partir des réserves intracellulaires (Smart & Lambert, 1996) et l'activation de la protéine kinase de type C (PKC) (Ueda et coll., 1995 ; Narita et coll., 1996). En outre, une augmentation des taux intracellulaires de calcium à partir des stocks intracellulaires (Tang et coll., 1995) ou du compartiment extracellulaire (Allouche et coll., 1996 ; Smart & Lambert, 1996) a également été démontrée. Une stimulation de l'activité adénylyl cyclase a par ailleurs été observée au niveau des tubercules olfactifs (Olianas et Onali, 1995). Ces données démontrent clairement que les récepteurs opioïdes de type δ peuvent directement stimuler la neurotransmission. Il n'est donc pas exclu que les deux types d'effets, stimulants et inhibiteurs, puissent coexister dans le striatum.

En conclusion, ces résultats indiquent que, dans le striatum de Rat, la DPDPE provoque une libération de glutamate en stimulant des récepteurs opioïdes de type δ probablement associés aux terminaisons cortico-striatales. De plus, l'augmentation de libération de dopamine induite par la stimulation des récepteurs δ apparaît résulter de cet accroissement des taux extracellulaires de glutamate.

PARTIE 2

4.2 RÔLE DES CELLULES GLIALES DANS LES LIBÉRATIONS STRIATALES DE GLUTAMATE ET DOPAMINE INDUITES PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ

Dans la première partie de cette étude, nous avons montré que la lésion des neurones cortico-striataux abolit la libération de dopamine induite par la DPDPE. Nos expériences de radiolisation ont, en outre, révélé que certains récepteurs opioïdes δ semblent localisés au niveau des terminaisons de ces neurones. Ces résultats suggèrent que la stimulation des récepteurs opioïdes δ striataux pourrait en premier lieu induire une libération de glutamate à partir des neurones d'origine corticale, qui conduirait ensuite à une libération de dopamine par les terminaisons des neurones nigro-striataux. Nos résultats ne permettent cependant pas d'exclure la possibilité que l'augmentation des taux extracellulaires de glutamate induite par la DPDPE puisse procéder d'un autre mécanisme. À cet égard, une modification des capacités de capture de glutamate, processus essentiellement glial, pourrait être également mise en jeu. Cette hypothèse apparaît d'autant plus pertinente qu'aucun contact synaptique direct n'a été mis en évidence entre les terminaisons cortico-striatales et nigro-striatales et que les synapses glutamatergiques sont précisément enserrées dans un étroit « fourreau » de cellules gliales. Le rôle important de ces cellules dans des mécanismes tels que la capture de glutamate, la synaptogenèse, ou encore la plasticité synaptique, est désormais communément admis (Araque et coll., 1998 ; Ullian et coll., 2001 ; Bowers & Kalivas, 2003 ; Slezak & Pfrieder, 2003). Les cellules gliales contribuent, en outre, au maintien de l'homéostasie du glutamate, via le cycle glutamate-glutamine dans lequel le glutamate libéré dans la synapse est tout d'abord recapté par les cellules gliales, où il est ensuite transformé en glutamine, laquelle, après efflux hors des cellules gliales et entrée dans les terminaisons glutamatergiques, constitue le principal précurseur de la synthèse neuronale de glutamate. À ces fonctions communément admises s'ajoutent de récentes données indiquant que les cellules gliales

pourraient également participer aux processus de neurotransmission, notamment en ce qui concerne le système glutamatergique. En effet, il est désormais démontré que ces cellules sont capables de relayer le signal glutamatergique, tant en ce qui concerne sa réception que son émission (*pour revue* : Volterra & Meldolesi, 2005 ; *cf.* chapitre précédent). Enfin, bien que Wang & Pickel (2001) l'aient faiblement observé *ex vivo*, des études *in vitro* sur cultures cellulaires indiquent que les cellules gliales pourraient également exprimer des récepteurs opioïdes de type δ (Eriksson et coll., 1990 ; Ruzicka et coll., 1995). Ces données suggèrent, par conséquent, que les cellules gliales pourraient jouer un rôle dans la libération de glutamate induite par la DPDPE ainsi que, par voie de conséquence, dans celle de dopamine.

Les astrocytes et les neurones ont en commun de nombreux récepteurs et cascades de signalisation. Les approches expérimentales visant à bloquer de manière sélective l'activité gliale dépendent de l'existence d'outils pharmacologiques spécifiques. Une toxicité s'exerçant sélectivement au niveau des cellules gliales a été rapportée pour de nombreux composés qui, hormis le cas particulier du fluorocitrate, présentent la caractéristique commune d'être tous des acides α -aminés dicarboxyliques, et possèdent donc, à ce titre, une structure similaire à celle du glutamate (Brennan et coll., 2004). Parmi ces composés, l'acide L- α -aminoadipique (L- α AA) développe une toxicité à l'égard des cellules gliales qui est de loin la mieux documentée. Elle a été initialement démontrée par Olney et coll. (1971) dont les travaux ont mis en évidence que l'injection d'un mélange racémique d'acide aminoadipique provoque des altérations dégénératives transitoires au niveau des astrocytes, sans que l'intégrité des cellules neuronales environnantes soit altérée. De nombreuses études ont, par la suite, confirmé la sélectivité de cet analogue structural du glutamate sur la viabilité des cellules gliales, tant *in vitro* qu'*in vivo* (Pedersen & Karlsen, 1979 ; Olney et coll., 1980 ; Huck et coll., 1984 ; Takada & Hattori, 1986 ; Mc Bean, 1990 ; Bridges et coll., 1992 ; Khurgel et coll., 1996 ; Nishimura et coll., 2000). Huck et coll. (1984) ont notamment démontré que le L- α AA, ajouté

au milieu de culture de cellules du cervelet, s'accumule sélectivement à l'intérieur des cellules gliales. Cette accumulation semble initialement résulter de l'activité, indépendante du Na^+ , de l'échangeur cystine-glutamate que le L- α AA emprunte et inhibe à des concentrations de l'ordre du μM (Pow, 2001 ; Tsai et coll., 1996). À des concentrations dans la gamme du mM, le L- α AA est également capté par les astrocytes, grâce aux transporteurs du glutamate dépendant du Na^+ au niveau desquels il entre en compétition avec le glutamate extracellulaire (Schousboe et coll., 1977 ; Charles & Chang, 1981 ; Huck et coll., 1984 ; Fletcher & Johnston, 1991 ; Pannicke et coll., 1994 ; Robinson & Dowd, 1997 ; Danbolt, 2001). Cependant, le mécanisme qui sous-tend précisément la toxicité gliale du L- α AA reste méconnu. En effet, certaines études suggèrent que l'accumulation (Na^+ -indépendante ou Na^+ -dépendante) du L- α AA dans les cellules gliales pourrait induire la réduction de la cystine intracellulaire, diminuant ainsi la synthèse de glutathion et générant un stress oxydatif (Harris, 1989 ; Kato et coll., 1993). Néanmoins, Chen et coll. (2000) ont proposé que le stress oxydatif pourrait en fait résulter de l'activation soutenue du transport Na^+ -dépendant du glutamate, qui induit une forte augmentation des demandes énergétiques des cellules dans le but de maintenir le gradient sodique engendrant le mécanisme de capture. Plus récemment, Brennan et coll. (2004) ont suggéré que la toxicité du L- α AA pourrait plutôt provenir d'une altération du métabolisme glial, affectant des enzymes et de voies métaboliques qui mettent en jeu le glutamate, notamment au niveau de la glutamine synthétase (GS). Néanmoins, en dépit de l'absence de consensus concernant le mécanisme supportant précisément sa toxicité, le L- α AA est un outil fréquemment employé pour détruire ou temporairement inactiver les cellules gliales (Brennan et coll., 2004 ; Reid & Farber, 2005 ; Vessal et coll., 2005 ; Leffler et coll., 2006 ; Zhuang et coll., 2006).

Dans cette seconde partie de notre étude, nous avons entrepris d'évaluer la contribution des cellules gliales dans les mécanismes de libération de glutamate et de dopamine induits par la

DPDPE. Dans ce but, les taux extracellulaires de glutamate et de dopamine ont été mesurés dans le striatum d'animaux ayant été préalablement exposés au L- α AA. Deux méthodologies distinctes ont été employées. Premièrement, l'effet du L- α AA sur les libérations de glutamate et de dopamine induites par la DPDPE a été étudié de manière précoce, par infusion directe de la gliotoxine via la sonde de microdialyse. Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de la DPDPE sur les taux extracellulaires de glutamate et de dopamine dans le striatum d'animaux soumis 2 jours plus tôt à une injection intra-striatale de L- α AA, de manière à induire une déficience majeure des fonctions gliales (modèle lésionnel). Les effets gliotoxiques du L- α AA sont, en effet, plus marqués 48 heures après son injection intracérébrale, caractérisés à ce stade par une large zone dépourvue de cellules gliales autour du site d'injection (Khurgel et coll., 1996). Enfin, nous avons testé les effets d'un inhibiteur spécifique de la capture du glutamate, l'acide L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylique (PDC), sur l'augmentation des taux de glutamate induite dans le striatum par la DPDPE.

4.2.1 EFFETS PRÉCOCES D'UNE ADMINISTRATION D'ACIDE L- α -AMINOADIPIQUE DANS LE STRIATUM

In vitro, l'addition directe de L- α AA dans le milieu d'incubation d'extraits striataux destinés au dosage de l'activité glutamine synthétase (GS) provoque, par rapport aux valeurs contrôles obtenues en l'absence de L- α AA, une réduction significative de cette activité, à la concentration de 5 mM (respectivement $16,9 \pm 0,7$ nmol/mg de protéines/min vs. $13,1 \pm 0,8$ nmol/mg de protéines/min ; - 22,4 % ; $t = 3,494$; $p = 0,002$; $n = 12$) et de 10 mM (respectivement $16,9 \pm 0,7$ nmol/mg de protéines/min vs. $9,8 \pm 0,7$ nmol/mg de protéines/min ; - 41,8 % ; $t = 6,882$; $p < 0,001$; $n = 12$). De même, l'ajout de 500 μ M de L- α AA dans le milieu d'incubation destiné aux expériences de capture sur synaptosomes striataux induit, en comparaison aux valeurs contrôles, une diminution de la capture de glutamate radiomarqué

(respectivement $0,72 \pm 0,03$ pmol/mg de protéines vs. $1,26 \pm 0,05$ pmol/mg de protéines ; -42,4 % ; $t = 8,785$; $p < 0,001$; $n = 12$). Cependant, comme résumé dans la Table 10, 2 heures après l'infusion locale de L- α AA dans le striatum (200 μ g pendant 20 min) via la sonde de dialyse (*cf.* expériences suivantes), aucune modification de l'activité GS n'est observée au niveau du striatum entier, par rapport au striatum contralatéral ($16,8 \pm 0,7$ nmol/mg de protéines/min vs. $16,2 \pm 1,1$ nmol/mg de protéines/min ; $t = -0,587$; $p > 0,05$; $n = 20$) ou au striatum ipsilatéral d'animaux témoins ($16,8 \pm 0,7$ nmol/mg de protéines /min vs. $16,6 \pm 1,5$ nmol/mg de protéines /min ; $t = 0,0982$; $p > 0,05$; $n = 20$). De plus, le contenu total en glutamate n'est pas affecté par ce traitement, en comparaison aux concentrations mesurées dans le striatum contralatéral ($53,6 \pm 6,8$ nmol/mg de protéines vs. $54,3 \pm 5,4$ nmol/mg de protéines ; $t = 0,233$; $p > 0,05$; $n = 12$) ou dans le striatum ipsilatéral d'animaux témoins ($53,6 \pm 6,8$ nmol/mg de protéines vs. $57,3 \pm 6,8$ nmol/mg de protéines ; $t = -0,378$; $p > 0,05$; $n = 12$). De même, le contenu total en dopamine est préservé, en comparaison au striatum contralatéral ($2,6 \pm 0,3$ nmol/mg de protéines vs. $2,5 \pm 0,3$ nmol/mg de protéines ; $t = -0,167$; $p > 0,05$; $n = 12$) ou au striatum ipsilatéral d'animaux contrôles ($2,6 \pm 0,3$ nmol/mg de protéines vs. $2,7 \pm 0,3$ nmol/mg de protéines ; $t = -0,386$; $p > 0,05$; $n = 12$). Enfin, la mesure des taux de DOPAC révèle, 2 heures après l'administration de L- α AA, une concentration de $2,8 \pm 0,4$ nmol/mg de protéines dans le striatum contralatéral vs. $3,1 \pm 0,6$ nmol/mg de protéines dans le striatum ipsilatéral ($t = 1,039$; $p > 0,05$; $n = 12$), alors que le contenu dans le striatum ipsilatéral d'animaux témoins est de $3,2 \pm 0,5$ nmol/mg de protéines ($t = -0,604$; $p > 0,05$; $n = 12$).

La glutamine synthétase (GS) est une enzyme exclusivement localisée dans les cellules gliales (Hertz, 1979), qui possède un rôle clé dans le cycle de libération et de recapture du glutamate entre terminaisons nerveuses et cellules gliales (Bradford et coll., 1978 ; Clements et coll., 1992). Récemment, Brennan et coll. (2004) ont émis l'hypothèse que la GS pourrait être la

	Témoins	L- α AA		Statistiques	
	Striatum ipsilatéral	Striatum contralatéral	Striatum ipsilatéral	(a)	(b)
Activité glutamine synthétase (nmol/mg de protéines/min)	16,6 \pm 1,5	16,2 \pm 1,1	16,8 \pm 0,7	NS	NS
Concentration striatale de glutamate (nmol/mg de protéines)	57,3 \pm 6,8	54,3 \pm 5,4	53,6 \pm 6,8	NS	NS
Concentration striatale de dopamine (nmol/mg de protéines)	2,7 \pm 0,3	2,5 \pm 0,3	2,6 \pm 0,3	NS	NS
Concentration striatale de DOPAC (nmol/mg de protéines)	3,2 \pm 0,5	3,1 \pm 0,6	2,8 \pm 0,4	NS	NS

Table 10 : Modifications neurochimiques induites dans le striatum deux heures après l'infusion intra-striatale de L- α AA.

Les différents paramètres neurochimiques sont mesurés dans le striatum entier, 2 heures après l'infusion intra-striatale de 200 μ g de L- α AA via la sonde de microdialyse. Chaque paramètre est mesuré dans le striatum ipsilatéral et contralatéral du groupe d'animaux ayant subi le traitement au L- α AA ainsi que dans le striatum ipsilatéral des animaux témoins. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées au moyen d'un test de Student apparié ou non ($n = 12$ à 20). (a) *vs.* striatum ipsilatéral du groupe témoin ; (b) *vs.* striatum contralatéral du groupe soumis à l'infusion de L- α AA (test apparié).

cible métabolique à l'origine des effets gliotoxiques du L- α AA. En effet, de nombreuses études ont confirmé l'effet inhibiteur de la GS induit par le L- α AA (Linser & Moscona, 1981 ; Mc Bean, 1994 ; Kato et coll., 1996) en tant que pseudo-substrat de cette enzyme (Wellner et coll., 1966). En raison de la spécificité cellulaire de la GS, la mesure de son activité enzymatique constitue un très bon index neurochimique de l'ampleur des altérations induites par le L- α AA sur le métabolisme glial. Dans la présente étude, l'activité GS mesurée *in vitro* après addition directe de L- α AA dans le milieu d'incubation est réduite de manière significative. Ce résultat corrobore les études précédentes indiquant que les altérations métaboliques induites par le L- α AA dans les cellules gliales débutent précocement. Contrairement aux résultats obtenus *in vitro*, l'infusion de L- α AA via la sonde de dialyse ne provoque aucune modification de l'activité de la GS évaluée 2 heures plus tard, dans le striatum entier. Ce résultat semble en désaccord avec l'interprétation précédente. Cependant, les capacités de dialyse des membranes constituant les sondes sont relativement faibles (environ 10 %), réduisant ainsi fortement la concentration de L- α AA dans le striatum. Ainsi, la concentration striatale en gliotoxine, qui est maximale au contact de la face externe de la membrane de dialyse, se trouve nécessairement réduite à distance plus éloignée, en raison de

sa diffusion dans le tissu cérébral. Il est, par conséquent, probable que les effets induits de manière précoce par le L- α AA restent circonscrits à l'environnement immédiat de la sonde de dialyse. En accord avec cette interprétation, Khurgel et coll. (1996) ont montré, dans des conditions expérimentales identiques, que les dommages causés aux cellules gliales, après une injection intracérébrale de L- α AA, sont décelables de manière précoce (dès la 4^{ème} heure), avec une augmentation significative de l'immunoréactivité GFAP à proximité du site d'injection. En relation avec nos résultats *in vitro*, ces données suggèrent que les altérations du métabolisme glial induites de manière précoce par le L- α AA, se manifestent, en premier lieu, à proximité du site d'injection et qu'elles ne sont donc pas quantifiables lors d'une mesure effectuée de manière globale à partir du striatum entier. De même, l'ajout de L- α AA dans le milieu d'incubation de préparations synaptosomales brutes, qui contiennent de nombreux éléments gliaux (Nakamura et coll., 1993), réduit de manière significative la capture *in vitro* de glutamate. Ce résultat est en accord avec les études indiquant qu'à des concentrations de l'ordre du mM, le L- α AA est un substrat pour le transporteur à haute affinité du glutamate (Pannicke et coll., 1994 ; Mc Bean, 1994 ; Tsai et coll., 1996). Ce transporteur a, par ailleurs, été récemment proposé comme le principal moyen d'accès de la gliotoxine à l'intérieur de cellules gliales tumorales (Brennan et coll., 2004).

Enfin, les concentrations tissulaires de glutamate, de dopamine et de DOPAC, mesurées dans le striatum entier, ne sont pas altérées 2 heures après l'infusion striatale de L- α AA. Cependant, à l'instar des résultats concernant la détermination de l'activité de la GS à partir de la structure entière, il est probable que ces données ne reflètent pas les effets neurochimiques exercés par le L- α AA dans l'environnement immédiat de la sonde.

4.2.2 EFFET D'UNE CO-INFUSION STRIATALE DE DPDPE ET DE L- α AA SUR LES TAUX EXTRACELLULAIRES DE GLUTAMATE

Les taux de glutamate, évalués à partir des 3 premiers dialysats, restent stables dans chaque groupe avant l'infusion striatale de DPDPE (Figure 37). De plus, ils ne diffèrent pas entre chaque groupe et sont, en moyenne, de $22,8 \pm 3,0$ pmol/min ($n = 32$).

Une ANOVA à 3 facteurs, effectuée à partir des données exprimées en % des taux de base de glutamate, avec [le traitement par le L- α AA], [le traitement par la DPDPE] et [le temps] comme facteurs, indique une interaction entre les facteurs [traitement DPDPE] et [temps] ($F(7,255) = 4,221$; $p < 0,001$) et entre les facteurs [traitement L- α AA] et [temps] ($F(7,255) = 6,633$; $p < 0,001$). En revanche, les facteurs [traitement L- α AA] et [traitement DPDPE] ne présentent aucune interaction ($F(1,255) = 0,595$; $p > 0,05$). Plus précisément, l'infusion locale de DPDPE (10 μ M) ou de L- α AA (200 μ g) dans le striatum, pendant une période de 20 min, augmente de manière significative les taux de glutamate dans, respectivement, les 2 ou 3 échantillons suivant le début du traitement. La concentration de glutamate dans les dialysats est, consécutivement au traitement par le L- α AA, augmentée de 53,0 % ($p = 0,012$; $n = 8$) et, 40 min plus tard, de 75,6 % ($p < 0,001$; $n = 8$) alors que, 20 min après l'infusion de DPDPE, elle est accrue de 60,8 % ($p < 0,001$; $n = 8$). La concentration en glutamate retrouve un niveau similaire à celui de la ligne de base après 60-80 min. Quand la DPDPE est co-infusée avec le L- α AA, un effet additif est observé sur les taux de glutamate qui, 20 min après le début du traitement, atteignent + 82,0 % ($p < 0,001$; $n = 8$) et, 40 min plus tard, + 186,0 % ($p < 0,001$; $n = 8$) (Figure 37).

De même, une ANOVA à 2 facteurs, effectuée à partir des aires sous la courbe, ne révèle aucune interaction [traitement L- α AA] x [traitement DPDPE] ($F(1,31) = 0,158$; $n = 8$), indiquant que les deux traitements produisent une synergie additive sur les concentrations de glutamate dans les dialysats.

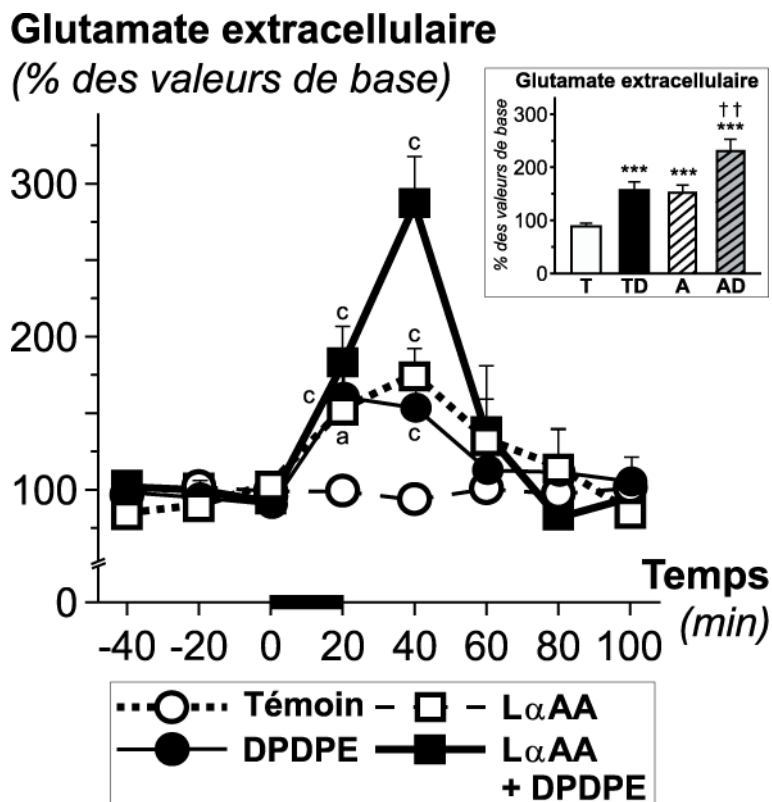


Figure 37 : Effet de la DPDPE et du L- α AA sur les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum.

Après une période d'équilibration de 2 heures, des échantillons de microdialyse sont successivement collectés toutes les 20 min et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en glutamate. Les 3 premiers échantillons, utilisés pour déterminer la libération basale de glutamate, sont suivis, pendant 20 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais), par l'infusion de DPDPE (10 μ M), de L- α -AA (10 μ g/ μ L) ou par la co-infusion de DPDPE (10 μ M) et de L- α -AA (10 μ g/ μ L), au débit de 1,0 μ L/min. La concentration basale de glutamate dans les dialysats, mesurée au cours de la collecte des 3 premiers échantillons, est de $22,8 \pm 3,0$ pmol/min ($n = 32$). Les données sont exprimées en % de la libération basale de glutamate. Les moyennes \pm S.E.M. de 8 animaux par groupe sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs et à mesures répétées suivie par un test de Tukey. (a) $P < 0,05$; (c) $P < 0,001$ vs. groupe témoin ($n = 8$). L'insert illustre la libération moyenne de glutamate évaluée pendant les 60 min suivant le début du traitement chez les animaux témoins (T) ou traités au L- α -AA (A) ainsi que chez les animaux témoins (TD) ou traités au L- α -AA (AD) et soumis à l'infusion intra-striatale de DPDPE. *** $P < 0,001$ vs. groupe témoin ; †† $P < 0,01$ vs. groupe DPDPE ($n = 8$).

Ces résultats confirment les études précédentes indiquant que la DPDPE, un agoniste sélectif des récepteurs δ , augmente les taux extracellulaires de glutamate (Matsumoto et coll., 1994 ; Billet et coll., 2004). De manière identique, l'infusion striatale de L- α AA, via la sonde de dialyse, provoque une augmentation rapide et significative des concentrations de glutamate dans les dialysats. Nos résultats confirment sur ce point les travaux de Paulsen & Fonnum (1989) indiquant que l'infusion striatale de fluorocitrate, une autre gliotoxine, augmente les

taux extracellulaires de glutamate au cours des premières heures suivant son administration. Il a été démontré que, dans la gamme du mM, le système de transport du glutamate représente une des toutes premières cibles gliales du L- α AA, que ce dernier, en tant que substrat, inhibe et emprunte pour s'accumuler à l'intérieur des cellules gliales (Pannicke et coll., 1994 ; Mc Bean, 1994 ; Tsai et coll., 1996). Néanmoins, de nombreuses études indiquent que, dans la gamme du μ M, l'accumulation du L- α AA au niveau glial peut également impliquer le système d'échange cystine-glutamate (X_C^-), lequel est, dans les conditions physiologiques, responsable d'une entrée Na^+ -indépendante de cystine dans les astrocytes, couplée à une sortie de glutamate, et dont le L- α AA est un substrat (Bannai, 1986 ; Kato et coll., 1993 ; Tsai et coll., 1996). L'augmentation rapide des taux extracellulaires de glutamate résultant de l'infusion de L- α AA pourrait par conséquent résulter :

- d'une action au niveau de X_C^- , responsable d'une augmentation de glutamate que les transporteurs à haute affinité du glutamate ne pourraient résorber ;
- d'une inhibition de la capture gliale du glutamate ;
- ou encore d'une conjonction de ces deux mécanismes.

Les expériences que nous avons menées ne permettent pas de déterminer la participation respective de ces deux processus dans la libération de glutamate induite par la DPDPE. Néanmoins, un élément de réponse pourrait être apporté par les données de la littérature qui n'indiquent pas clairement si l'influx de L- α AA via X_C^- est capable de reproduire la libération de glutamate induite dans les conditions normales par l'entrée de cystine via l'échangeur. En effet, bien que les travaux princeps de Bannai (1986), qui ont révélé l'existence du système d'échange cystine-glutamate à partir de fibroblastes humains, indiquent que l'application de L- α AA stimule la libération de glutamate, Kato et coll. (1993)

ont pour leur part observé une abolition par le DL- α AA de la libération de glutamate induite par la cystine. De manière similaire, d'autres études ont montré que le L- α AA inhibe la libération de glutamate à partir de cultures de cellules microgliales (Piani & Fontana, 1994 ; Haugstad & Langmoen, 1997 ; Nakamura et coll., 2003b). Ces résultats suggèrent que la contribution du système de transport glial du glutamate dans la libération de glutamate induite par le L- α AA pourrait être prépondérante.

Lorsque le L- α AA et la DPDPE sont perfusés de manière concomitante, une forte augmentation des taux de glutamate est observée, selon un mécanisme de synergie additive. L'effet stimulant de la DPDPE sur les taux extracellulaires de glutamate semble donc être indépendant des fonctions gliales altérées de manière précoce par le L- α AA, à savoir \bar{X}_C et/ou le système de capture gliale du glutamate.

4.2.3 EFFET D'UNE CO-INFUSION STRIATALE DE DPDPE ET DE L- α AA SUR LES CONCENTRATIONS EXTRACELLULAIRES DE DOPAMINE

Dans les conditions de base, les concentrations de dopamine dans les dialysats striataux, évaluées à partir des 3 premiers échantillons, sont stables dans chaque groupe avant l'infusion striatale de DPDPE (Figure 38). De plus, le taux de dopamine ne diffère pas entre chaque groupe et est, en moyenne, égal à $46,1 \pm 6,7$ fmol/min ($n = 32$).

Une ANOVA à 3 facteurs est effectuée à partir des données exprimées en % des concentrations basales de dopamine dans les dialysats, avec [le traitement par le L- α AA], [le traitement par la DPDPE] et [le temps] comme facteurs. Cette analyse révèle une interaction entre les facteurs [traitement DPDPE] et [temps] ($F(7,255) = 6,421$; $p < 0,001$) et entre les facteurs [traitement L- α AA] et [temps] ($F(7,255) = 7,459$; $p < 0,001$), sans interaction entre les facteurs [traitement DPDPE] et [traitement L- α AA] ($F(1,255) = 2.592$; $p > 0,05$). Plus

Dopamine extracellulaire (% des valeurs de base)

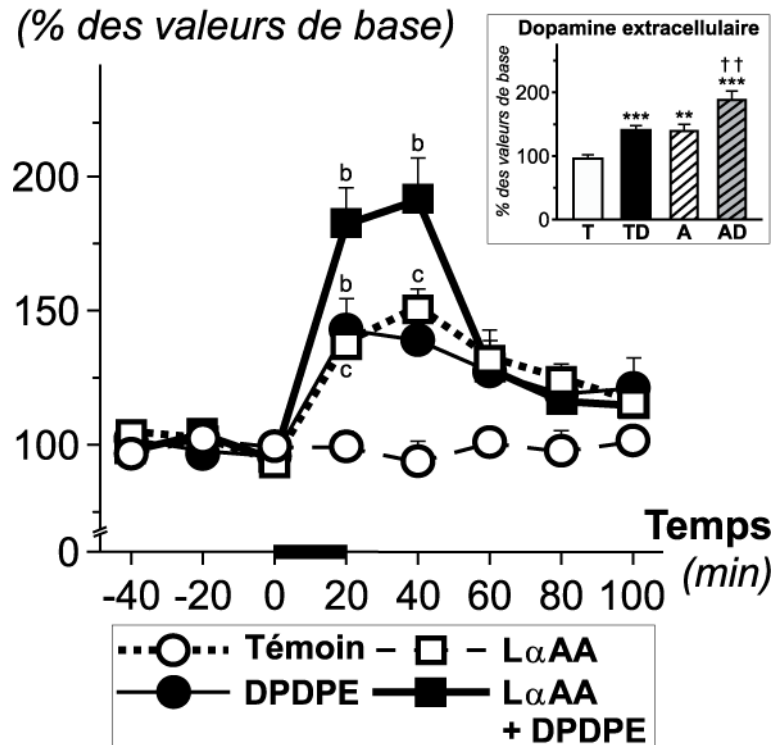


Figure 38 : Effet de la DPDPE et du L- α AA sur les concentrations de dopamine dans les dialysats collectés à partir du striatum.

Après une période d'équilibration de 2 heures, des échantillons de microdialyse sont successivement collectés toutes les 20 min et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en dopamine. Les 3 premiers échantillons, utilisés pour déterminer la libération basale de dopamine, sont suivis, pendant 20 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais), par l'infusion de DPDPE (10 μ M), de L- α -AA (10 μ g/ μ L) ou par la co-infusion de DPDPE (10 μ M) et de L- α -AA (10 μ g/ μ L), au débit de 1,0 μ L/min. La concentration basale de dopamine dans les dialysats, mesurée au cours de la collecte des 3 premiers échantillons, est de $46,1 \pm 6,7$ fmol/min ($n = 32$). Les données sont exprimées en % de la libération basale de dopamine. Les moyennes \pm S.E.M. de 8 animaux par groupe sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs et à mesures répétées suivie par un test de Tukey. (b) $P < 0,01$; (c) $P < 0,001$ vs. groupe témoin ($n = 8$). L'insert illustre la libération moyenne de dopamine évaluée pendant les 60 min suivant le début du traitement chez les animaux témoins (T) ou traités au L- α -AA (A) ainsi que chez les animaux témoins (TD) ou traités au L- α -AA (AD) et soumis à l'infusion intra-striatale de DPDPE. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. groupe témoin ; †† $P < 0,01$ vs. groupe DPDPE ($n = 8$).

précisément, l'infusion locale de DPDPE (10 μ M) ou de L- α AA (200 μ g) dans le striatum pendant une période de 20 min augmente significativement les concentrations de dopamine dans, respectivement, les 2 et 3 dialysats suivant le début du traitement. Le taux de dopamine est respectivement accru de 37,0 % ($p = 0,001$; $n = 8$) et de 50,3 % ($p = 0,001$; $n = 8$) 20 et 40 min après le traitement par le L- α AA, et de 42,8 % ($p = 0,008$; $n = 8$) 20 min après l'infusion de DPDPE. Les concentrations de dopamine retrouvent des valeurs similaires à

celles de la ligne de base après 60-80 min. Quand la DPDPE est co-infusée avec le L- α AA, un effet additif est observé sur les concentrations de dopamine contenues dans les dialysats qui, 20 min après le début du traitement, atteignent + 84,8 % ($p = 0,005$; $n = 8$) et, 40 min plus tard, + 94,2 % ($p = 0,011$; $n = 8$) (Figure 38).

De même, une ANOVA à 2 facteurs, effectuée à partir des aires sous la courbe, ne révèle aucune interaction [traitement L- α AA] x [traitement DPDPE] ($F(1,31) = 0,0179$; $p > 0,05$), indiquant que les deux traitements produisent une synergie additive sur les concentrations de dopamine mesurées dans les dialysats.

À l'instar des données obtenues pour le glutamate, ces résultats démontrent que l'infusion de L- α AA dans le striatum augmente les taux extracellulaires de dopamine. Comme le glutamate stimule la libération de dopamine (Giorguieff-Chesselet et coll., 1979 ; Westerink et coll., 1989b ; Wang 1991), l'augmentation des taux de dopamine résultant de l'infusion striatale de L- α AA reflète donc probablement l'effet stimulant du L- α AA sur la libération de glutamate. L'infusion concomitante de L- α AA et de DPDPE produit sur les taux extracellulaires de dopamine des effets synergiques de type additif. Ces données confirment ainsi les résultats obtenus dans le cadre de nos expériences de lésion corticale, indiquant que l'effet stimulant induit par la DPDPE, sur les taux extracellulaires de dopamine, présente un profil pharmacologique identique à celui qu'elle exerce sur les taux de glutamate et que ces modulations pourraient donc être de même nature.

4.2.4 MODIFICATIONS NEUROCHIMIQUES INDUITES DANS LE STRIATUM DEUX JOURS APRÈS INJECTION DE L- α AA

Les résultats des expériences précédentes indiquent que les effets stimulants induits par la DPDPE sur la libération de glutamate et, consécutivement, sur celle de dopamine ne mettent probablement pas en jeu les fonctions gliales précocement inactivées par le L α AA : la capture

de glutamate et le système d'échange cystine/glutamate. En revanche, les cellules gliales apparaissent capables d'influer sur les taux extracellulaires de glutamate selon divers autres processus, au rang desquels une libération dépendante du Ca^{2+} , par un mécanisme d'exocytose mettant en jeu des vésicules synaptiques, est de plus en plus fréquemment évoquée (*pour revue* : Montana et coll., 2006). Pour déterminer si l'un de ces mécanismes pourrait être impliqué dans les effets stimulants induits par la DPDPE, nous avons eu recours aux propriétés gliotoxiques du L- α AA, mais à des temps plus tardifs, de manière à inactiver totalement les cellules gliales.

Comme cela est résumé dans la Table 11, l'injection de L- α AA dans le striatum droit, à raison de 200 μg dans 5 μL , provoque, deux jours plus tard, une réduction significative de l'activité GS en comparaison au striatum contralatéral ($13,3 \pm 0,6$ nmol/mg de protéines/min vs. $17,2 \pm 0,7$ nmol/mg de protéines/min ; - 22,7 % ; $t = 9,444$; $p < 0,001$; $n = 9$) ou au striatum ipsilatéral d'animaux témoins ($13,3 \pm 0,6$ nmol/mg de protéines/min vs. $16,9 \pm 0,7$ nmol/mg de protéines/min ; - 21,3 % ; $t = - 3,862$; $p = 0,001$; $n = 9$ et 12 respectivement). Cette injection provoque également une réduction significative du contenu striatal total en glutamate, en comparaison au striatum contralatéral ($34,6 \pm 4,6$ nmol/mg de protéines vs. $54,2 \pm 6,0$ nmol/mg de protéines ; - 36,2 % ; $t = 6,937$; $p < 0,001$; $n = 12$) ou au striatum ipsilatéral d'animaux témoins ($34,6 \pm 4,6$ nmol/mg de protéines vs. $57,3 \pm 6,8$ nmol/mg de protéines ; - 39,6 % ; $t = - 2,778$; $p = 0,011$; $n = 12$). De même, la capture synaptosomale de glutamate tritié dans le striatum ipsilatéral d'animaux ayant reçu deux jours plus tôt une injection intra-striatale de L- α AA ($0,87 \pm 0,04$ pmol/mg de protéines) est réduite de manière significative par rapport au striatum contralatéral ($1,26 \pm 0,03$ pmol/mg de protéines ; - 31,0 % ; $t = 7,054$; $p < 0,001$; $n = 9$) ou au striatum ipsilatéral d'animaux témoins ($1,27 \pm 0,07$ nmol/mg de protéines ; - 31,5 % ; $t = - 4,578$; $p < 0,001$; $n = 12$). Cependant, le contenu total en dopamine du striatum ipsilatéral ($2,5 \pm 0,3$ nmol/mg de protéines) n'est pas altéré, en

	Témoins	L- α AA		Statistiques	
	Striatum ipsilatéral	Striatum contralatéral	Striatum ipsilatéral	(a)	(b)
Activité glutamine synthétase (nmol/mg de protéines/min)	16,9 \pm 0,7	17,2 \pm 0,7	13,3 \pm 0,6	*** (-21,3%)	*** (-22,7%)
Concentration striatale de glutamate (nmol/mg de protéines)	57,3 \pm 6,8	54,2 \pm 6,0	34,6 \pm 4,6	* (-39,6%)	*** (-36,2%)
Capture synaptosomale de glutamate (pmol/mg de protéines)	1,27 \pm 0,07	1,26 \pm 0,03	0,87 \pm 0,04	*** (-31,5%)	*** (-31,0%)
Concentration extracellulaire basale de glutamate (pmol/min)	22,8 \pm 3,0	ND	10,2 \pm 2,0	** (-51,2%)	NS
Concentration striatale de dopamine (nmol/mg de protéines)	2,7 \pm 0,3	2,6 \pm 0,3	2,5 \pm 0,3	NS	NS
Concentration striatale de DOPAC (nmol/mg de protéines)	3,2 \pm 0,5	2,8 \pm 0,7	2,8 \pm 0,4	NS	NS
Capture synaptosomale de dopamine (pmol/mg de protéines)	4,9 \pm 0,2	5,2 \pm 0,2	5,4 \pm 0,3	NS	NS
Concentration extracellulaire basale de dopamine (fmol/min)	216,9 \pm 24,1	ND	167,6 \pm 22,4	NS	NS

Table 11 : Modifications neurochimiques induites dans le striatum deux jours après l'injection intra-striatale de L- α AA.

Les différents paramètres neurochimiques sont mesurés dans le striatum entier, deux jours après l'injection intra-striatale de 200 μ g de L- α AA. Chaque paramètre est mesuré dans le striatum ipsilatéral et contralatéral du groupe d'animaux ayant subi le traitement par le L- α AA ainsi que dans le striatum ipsilatéral des animaux témoins. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées au moyen d'un test de Student apparié ou non (n = 9 ou 12). (a) vs. striatum ipsilatéral du groupe témoin ; (b) vs. striatum contralatéral du groupe soumis à l'infusion de L- α -AA (test apparié). * P < 0,05 ; *** P < 0,001.

comparaison au striatum contralatéral (2,6 \pm 0,3 nmol/mg de protéines ; t = 0,754 ; p > 0,05 ; n = 12) ou au striatum ipsilatéral d'animaux témoins (2,7 \pm 0,3 nmol/mg de protéines ; t = 0,514 ; p > 0,05 ; n = 12). Le taux de DOPAC dans le striatum ipsilatéral d'animaux préalablement traités par le L- α AA (2,8 \pm 0,4 nmol/mg de protéines) est également similaire à celui du striatum contralatéral (2,8 \pm 0,7 nmol/mg de protéines ; t = - 0,310 ; p > 0,05 ; n = 12) ou du striatum ipsilatéral d'animaux témoins (3,2 \pm 0,5 nmol/mg de protéines ; t = - 0,600 ; p > 0,05 ; n = 12). La capture de [3 H]-dopamine, évaluée sur des synaptosomes préparés à partir du striatum ipsilatéral (5,4 \pm 0,3 pmol/mg de protéines) ne diffère pas, quant à elle, de celle mesurée dans le striatum contralatéral (5,2 \pm 0,2 pmol/mg de protéines ; t = - 0,818 ; p > 0,05 ; n = 9) ou dans le striatum ipsilatéral d'animaux témoins (4,9 \pm 0,2 pmol/mg de protéines ; t = 1,130 ; p > 0,05 ; n = 9 ou 12 respectivement).

Contrairement aux expériences menées *ex vivo* 2 heures après l'infusion de L- α AA, les dosages effectués dans le striatum entier 2 jours après l'injection de L- α AA révèlent une diminution significative de l'activité GS (environ - 20 %). Ce résultat semble en désaccord avec les travaux de Mc Bean (1994) indiquant que l'injection du mélange racémique d'acide α -aminoadipique (à la dose de 100 μ g) induit 6 heures plus tard une diminution transitoire de l'activité de la GS, qui n'est plus observable après 24 heures. Cependant, nous avons utilisé dans cette étude l'isomère L, plus puissant (Olney et coll., 1980 ; Kato et coll., 1996) que l'isomère D, à la dose de 200 μ g pour laquelle les propriétés gliotoxiques sont maximales 48 heures après l'injection (Khurgel et coll., 1996). La lésion striatale induite, deux jours après l'injection de L- α AA affecte les concentrations tissulaires de glutamate (- 40 %). De manière similaire, la capture de glutamate mesurée à partir de synaptosomes striataux est diminuée 2 jours après l'injection de L- α AA dans le striatum (- 55 %). La GS, exclusivement localisée dans les cellules gliales (Hertz, 1979), est une enzyme clé de l'homéostasie du glutamate (van der Berg & Garfinkel, 1971 ; Benjamin & Quastel, 1972 ; Berl & Clarke, 1983 ; Ottersen et coll., 1992 ; Rae et coll., 2003 ; Waagepetersen et coll., 2005). De même, la capture synaptosomale de glutamate est principalement le fait de vésicules d'origine gliale (Ginsberg et coll., 1995). Les réductions de l'activité GS, des contenus tissulaires de glutamate et de la capture synaptosomale de glutamate, observées 2 jours après l'injection striatale de L- α AA, suggèrent, par conséquent, une diminution du nombre de cellules gliales attestant de la toxicité effective du L- α AA. Cette interprétation est en accord avec le processus dégénératif observé par Khurgel et coll. (1996) dans des conditions identiques. À l'inverse, nous n'avons observé aucune modification de la capture synaptosomale de dopamine, qui est généralement considérée comme un index fiable de l'innervation dopaminergique. Ainsi, elle n'est pas altérée par l'administration chronique d'halopéridol, un neuroleptique affectant la transmission dopaminergique, ou de bromocriptine, un anti-parkinsonien agoniste direct du

récepteur D₂ (Naudon et coll., 1995). De plus, les contenus tissulaires de dopamine et de DOPAC ne sont pas non plus perturbés 2 jours après la lésion des cellules gliales striatales. Ces résultats indiquent, par conséquent, la préservation de l'intégrité fonctionnelle des terminaisons nigro-striatales et suggèrent que les capacités de ces dernières à libérer de la dopamine, en réponse à une augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate, ne sont pas altérées.

4.2.5 EFFET D'UNE INFUSION INTRA-STRIATALE DE DPDPE SUR LES TAUX EXTRACELLULAIRES DE GLUTAMATE DEUX JOURS APRÈS INJECTION DE L- α AA

Les effets de la DPDPE sur les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés chez des animaux ayant reçu, 2 jours plus tôt, une injection intra-striatale de L- α AA sont étudiés selon deux approches méthodologiques, en absence ou en présence de glutamine.

4.2.5.1 MILIEU DÉPOURVU DE GLUTAMINE

Dans les conditions de base, les taux de glutamate, évalués à partir des 3 premiers dialysats collectés, sont stables dans chaque groupe avant l'infusion intra-striatale de DPDPE (Figure 39). Cependant, 2 jours après l'injection de L- α AA dans le striatum, les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum ipsilatéral sont significativement réduites par rapport à celles mesurées chez les animaux témoins ($10,2 \pm 2,0$ pmol/min vs. $22,8 \pm 3,0$ pmol/min ; - 55,2 % ; $t = 2,765$; $p = 0,006$; $n = 16$ et 32 respectivement).

Une ANOVA à 3 facteurs est effectuée à partir des valeurs exprimées en % des taux de base de glutamate, avec comme facteurs [la lésion par le L- α AA], [le traitement par la DPDPE] et [le temps]. Cette analyse montre une interaction entre les facteurs [lésion L- α AA] et [traitement DPDPE] ($(F(7,255) = 7,564$; $p = 0,006$). Plus précisément, une ANOVA à

Glutamate extracellulaire (% des valeurs de base)

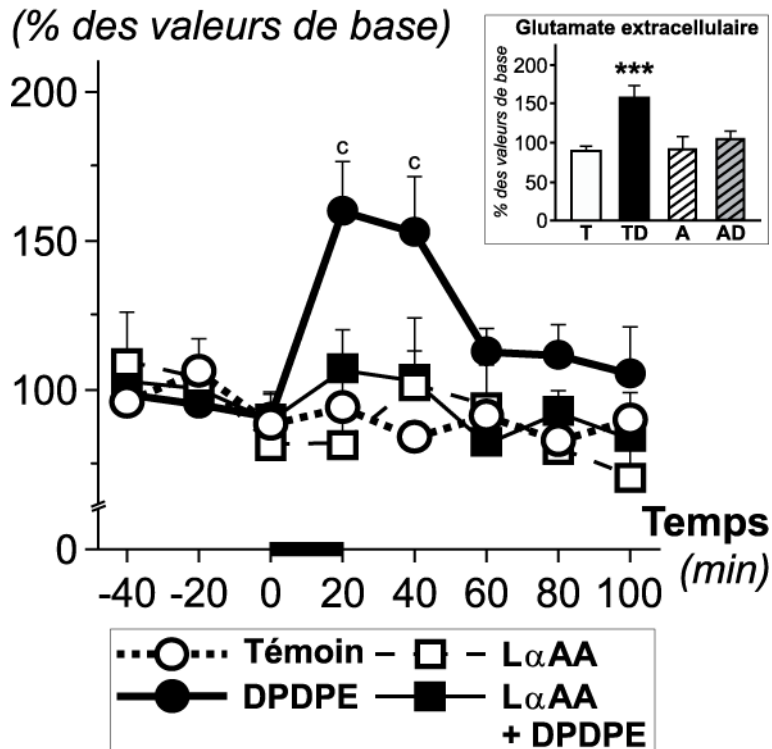


Figure 39 : Effet de la DPDPE sur les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis ou non, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L- α AA.

Avant l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, les animaux sont soumis ou non à une injection intra-striatale et ipsilatérale de L- α AA (200 μ g dans 5 μ L ; 0,5 μ L/min). Deux jours plus tard, une sonde est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer au débit de 1,0 μ L/min. Après une période d'équilibration de 2 heures, les dialysats sont successivement collectés toutes les 20 min et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en glutamate. Les 3 premiers échantillons, utilisés pour déterminer la libération basale de glutamate, sont suivis, pendant 20 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais), par l'infusion de DPDPE (10 μ M). La concentration basale de glutamate dans les dialysats, mesurée au cours de la collecte des 3 premiers échantillons, est de $22,8 \pm 3,0$ pmol/min chez les animaux témoins (n = 32) vs. $10,2 \pm 2,0$ pmol/min pour les animaux ayant subi l'injection intra-striatale de L- α AA (n = 16 ; t = 2,765 ; p = 0,006). Les données sont exprimées en % de la libération basale de glutamate. Les moyennes \pm S.E.M. de 8 animaux par groupe sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. (c) P < 0,001 vs. groupe témoin (n = 8). L'insert illustre la libération moyenne de glutamate évaluée pendant les 60 min suivant le début du traitement chez les animaux témoins (T) ou lésés au L- α -AA (A) ainsi que chez les animaux témoins (TD) ou lésés au L- α -AA (AD) et soumis à l'infusion intra-striatale de DPDPE. *** P < 0,001 vs. groupe témoin (n = 8).

mesures répétées et à 2 facteurs révèle que l'infusion intra-striatale de DPDPE (10 μ M) sur une période de 20 min, produit, chez les animaux témoins, une augmentation significative des concentrations de glutamate dans les 2 dialysats suivant le début du traitement (interaction [traitement DPDPE] x [temps] ; F(7,127) = 2,57 ; p < 0,001) alors qu'elle reste sans effet chez les animaux ayant reçu 2 jours plus tôt une injection de L- α AA dans le striatum ipsilatéral (

interaction [traitement DPDPE] x [temps] ; $F(7,127) = 0,863$; $p > 0,05$). La DPDPE augmente les concentrations de glutamate dans les dialysats de 60,8 % ($p < 0,001$; $n = 8$) 20 min après son infusion dans le striatum d'animaux témoins et le taux de glutamate revient au niveau de la ligne de base après 60-80 min. Cependant, l'injection préalable de L- α AA dans le striatum prévient cette augmentation des concentrations de glutamate induite dans les dialysats par la DPDPE (Figure 39).

Une ANOVA à 2 facteurs, effectuée à partir des aires sous la courbe, confirme l'interaction significative [lésion L- α AA] x [traitement DPDPE] ($F(1,31) = 4,932$; $p = 0,035$) et indique que l'augmentation des taux de glutamate induite par la DPDPE (+ 76,6 % ; $p = 0,003$; $n = 8$; insert de la Figure 39) est abolie par la lésion du striatum résultant de l'injection préalable de L- α AA.

De manière similaire aux résultats obtenus concernant les concentrations tissulaires de glutamate, la lésion des cellules gliales, induite 2 jours après l'injection intra-striatale de L- α AA, réduit significativement les taux extracellulaires de glutamate mesurés dans les conditions de base par microdialyse (- 55 %). Cette lésion provoque, en outre, une inhibition de l'activité de la GS, évaluée à environ - 20 % dans le striatum entier et correspondant vraisemblablement à une réduction de plus grande ampleur dans l'environnement immédiat de la sonde. Nos résultats apparaissent ainsi cohérents avec la notion, communément admise, d'un rôle central de la GS dans l'homéostasie du glutamate (van der Berg & Garfinkel, 1971 ; Benjamin & Quastel, 1972 ; Berl & Clarke, 1983 ; Ottersen et coll., 1992 ; Rae et coll., 2003 ; Waagepetersen et coll., 2005). Toutefois, certains auteurs ont émis des doutes concernant l'importance physiologique du cycle glutamine/glutamate (*pour revue* : Danbolt, 2001). En effet, il a, par exemple, été démontré que, bien que largement prédominante dans les neurones, la glutaminase activée par le phosphate (PAG) peut également être exprimée par des astrocytes en culture (Kvamme et coll., 1982 ; Hogstad et coll., 1988), s'opposant ainsi au

concept d'un cycle glutamine/glutamate opérant entre cellules gliales et neurones de manière stœchiométrique. De plus, il semble que certaines populations de neurones glutamatergiques n'expriment pas la PAG (Ottersen et coll., 1998 ; Laake et coll., 1999). Par ailleurs, il a été mis en évidence que les neurones glutamatergiques pourraient, indépendamment d'un apport en glutamine, entretenir une libération de glutamate de par leur capacité à carboxyler le pyruvate, comblant ainsi, au sein du cycle des acides tricarboxyliques, la perte en α -cétoglutarate inhérente à la synthèse de glutamate (Hassel & Brathe, 2000). Une indépendance relative des neurones glutamatergiques vis-à-vis de la glutamine a été à nouveau évoquée très récemment par Kam & Nicoll (2007). Ces auteurs ont rapporté, à partir de neurones en culture, qu'une inhibition de l'activité GS par la L-méthionine sulfoximine (MSO) provoque une diminution des réponses postsynaptiques induites par le glutamate, d'une manière transitoire et indépendante d'un enrichissement du milieu en glutamine. Toutefois, ces résultats s'opposent aux nombreuses données confirmant le rôle primordial de la GS dans le maintien de la transmission glutamatergique. Ainsi, il apparaît que le glutamate est presque exclusivement converti en glutamine dans des astrocytes en culture constamment approvisionnés en glutamate (Fonseca et coll., 2005). En outre, une synthèse *de novo* de glutamate au niveau des neurones glutamatergiques reste un sujet particulièrement controversé puisque la carboxylation enzymatique du pyruvate au sein de ces neurones n'a pas été observée par de nombreux auteurs (Yu et coll., 1983 ; Cesar & Hempracht, 1995 ; Waagepetersen et coll., 2001 ; Jitrapakdee et coll., 2006). Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'inhibition de la disponibilité en glutamine réduit les stocks de glutamate neurotransmetteur, qu'une synthèse *de novo* de glutamate ne peut restaurer (Rae et coll., 2003). Les études par résonance magnétique nucléaire (RMN) indiquent, de plus, que la capture de glutamate par les cellules gliales et le transport de la glutamine dans les terminaisons glutamatergiques constituent *in vivo* une voie métabolique majeure (Shen et

coll., 1999 ; Hertz et coll., 2000 ; Gruetter et coll., 2001 ; Lebon et coll., 2002 ; Rothman, 2003). Enfin, les données initiales de Bradford (1978), indiquant que la majeure partie du glutamate neurotransmetteur (80 %) provient du cycle de la glutamine, ont été récemment confirmées (Lieth et coll., 2001 ; Sibson et coll., 2001), bien que l'appréciation en été revue à la baisse (60 à 70 %). En accord avec cette notion, nos résultats indiquent que la lésion des cellules gliales induite 2 jours après l'injection de L α AA s'accompagne simultanément d'une inhibition de l'activité de la GS et d'une baisse des concentrations tissulaire et extracellulaire de glutamate, suggérant ainsi une profonde altération du système de transmission glutamatergique.

La lésion des cellules gliales observée 2 jours après l'injection striatale de L- α AA abolit l'effet stimulant de la DPDPE vis-à-vis des taux extracellulaires de glutamate. De prime abord, ce résultat pourrait suggérer une implication sélective des cellules gliales dans la libération striatale de glutamate, induite par la stimulation des récepteurs opioïdes δ . Certaines données de la littérature semblent en faveur de cette hypothèse. Premièrement, des études effectuées à partir de cultures cellulaires ont révélé la présence de récepteurs opioïdes de type δ au niveau des cellules gliales (Eriksson et coll., 1990, Ruzicka et coll., 1995). De plus, il a été montré *in vitro* que la stimulation de ces récepteurs serait en mesure de mobiliser le calcium intracellulaire (Thorlin et coll., 1998). Enfin, de nombreuses études indiquent que les cellules gliales participent aux processus de neurotransmission, notamment en ce qui concerne le glutamate, pour lequel leur contribution a été démontrée, aussi bien au niveau de l'émission du signal glutamatergique (Szatkowski et coll., 1990 ; Parpura et coll., 1994 ; Warr et coll., 1999) que de sa réception (Clark & Barbour, 1997 ; Grosche et coll., 1999 ; Huang et coll., 2004). Cependant, Wang & Pickel (2001) ont récemment démontré *ex vivo* que le nombre de récepteurs opioïdes de type δ exprimés par les cellules gliales semble particulièrement faible. Comme le suggèrent les diminutions des concentrations tissulaires et extracellulaires de

glutamate observées 2 jours après la lésion par le L- α AA, l'absence d'effet de la DPDPE pourrait, au contraire, refléter une incapacité des neurones glutamatergiques à augmenter la libération de glutamate en réponse à la stimulation des récepteurs opioïdes δ . En effet, l'inhibition de l'activité de la GS et des taux tissulaire et extracellulaire de glutamate observés, dans le striatum, deux jours après l'injection de L α AA suggèrent une inactivation massive des cellules gliales localisées dans l'environnement immédiat de la sonde et une importante altération de la transmission glutamatergique.

4.2.5.2 MILIEU ENRICHI EN GLUTAMINE

Nos résultats précédents suggèrent que l'inhibition de l'activité de la GS produite, après 2 jours, par le L α AA pourrait avoir profondément affecté les capacités fonctionnelles des neurones glutamatergiques. Pour confirmer ce point, nous avons reproduit la même série d'expériences en perfusant cette fois une solution de dialyse supplémentée en glutamine, à une concentration reproduisant celle évaluée, dans les conditions physiologiques, dans le compartiment extracellulaire (Segovia & Mora, 1998 ; Behrens et coll., 2002 ; Molchanova et coll., 2004).

L'infusion striatale de glutamine (Figure 40) provoque, par rapport aux concentrations de base, une forte augmentation des concentrations de glutamate chez des animaux ayant subi, 2 jours plus tôt, une lésion des cellules gliales, par injection intra-striatale de L- α AA ($185,0 \pm 13,2$ pmol/min vs. $7,8 \pm 0,2$ pmol/min ; + 2271,8 % ; $t = - 6,750$; $p = 0,003$; $n = 3$). Une ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées est effectuée à partir des valeurs exprimées en % des taux de base de glutamate, avec [le temps] comme facteur. Cette analyse démontre que l'infusion de glutamine (2,5 mM) provoque une augmentation significative des taux de glutamate en fonction du temps ($F(14,44) = 16,228$; $p < 0,001$). Plus précisément, elle révèle que l'infusion continue de glutamine (2,5 mM) sur une période de 180 min produit, 80 min

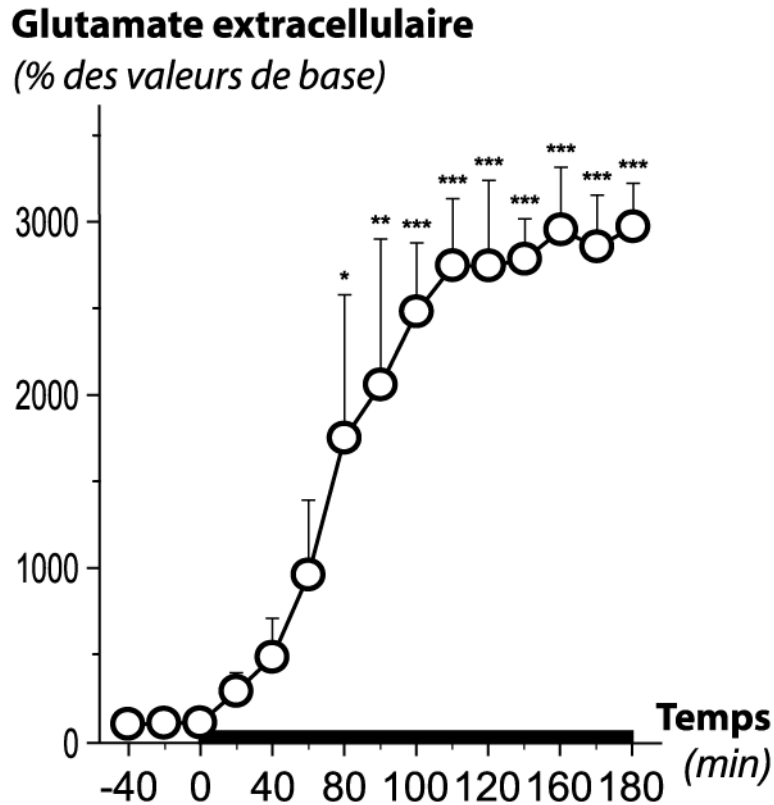


Figure 40 : Effet de la glutamine sur les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum chez des animaux soumis, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L- α AA.

Avant l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, les animaux sont soumis à une injection intra-striatale et ipsilatérale de L- α AA (200 μ g dans 5 μ L ; 0,5 μ L/min). Deux jours plus tard, une sonde est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer au débit de 1,0 μ L/min. Après une période d'équilibration de 2 heures, les dialysats sont successivement collectés toutes les 20 min et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en glutamate. Les 3 premiers échantillons, utilisés pour déterminer la libération basale de glutamate, sont suivis d'une infusion continue de glutamine (2,5 mM ; portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais). La concentration basale de glutamate dans les dialysats, mesurée au cours de la collecte des 3 premiers échantillons est de $7,8 \pm 0,2$ pmol/min. Les données sont exprimées en % de la libération basale de glutamate. Les moyennes \pm S.E.M. de 3 animaux par groupe sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées suivie par un test de Tukey. * $P < 0,5$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. concentrations basales (n = 3).

plus tard, une augmentation significative des concentrations de glutamate (+ 1281,2 % ; $p = 0,033$; n = 3) qui se stabilise à partir de 110 min (+ 2381,1 % ; $p < 0,001$; n = 3) et perdure jusqu'à la fin du traitement (Figure 40).

Deux heures après l'ajout de glutamine (2,5 mM) au milieu de microdialyse, les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis 2 jours plus tôt à une lésion par le L- α AA sont stables (Figure 41, 3 premiers échantillons).

Glutamate extracellulaire

(% des valeurs de base)

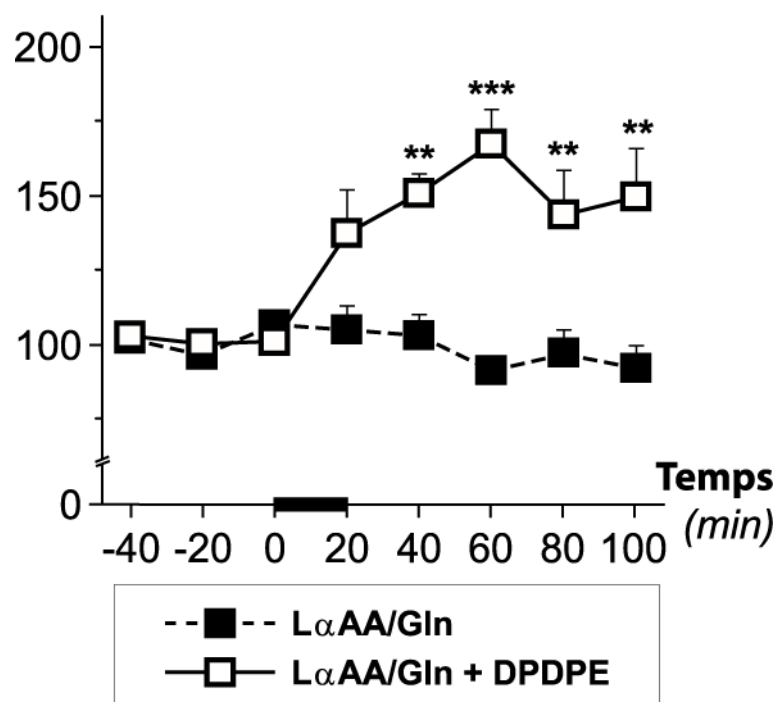


Figure 41 : Effet de la DPDPE, en présence de glutamine, sur les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L- α AA.

Avant l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, les animaux sont soumis à une injection intra-striatale et ipsilatérale de L- α AA (200 μ g dans 5 μ L ; 0,5 μ L/min). Deux jours plus tard, une sonde est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer contenant 2,5 mM de glutamine, au débit de 1,0 μ L/min. Après une période d'équilibration de 2 heures, les dialysats sont successivement collectés toutes les 20 min et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en glutamate. Les 3 premiers échantillons, utilisés pour déterminer la libération basale de glutamate, sont suivis, pendant 20 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais), par l'infusion de DPDPE (10 μ M). La concentration basale de glutamate dans les dialysats, mesurée au cours de la collecte des 3 premiers échantillons, est similaire dans les 2 groupes avec une valeur moyenne de $197,7 \pm 12,0$ pmol/min. Les données sont exprimées en % de la libération basale de glutamate. Les moyennes \pm S.E.M. de 6 animaux par groupe sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. ** P < 0,01 et *** P < 0,001 vs. groupe témoin (n = 6).

Une analyse ANOVA à 2 facteurs est effectuée à partir des valeurs exprimées en % des taux de base de glutamate, avec comme facteurs [le traitement par la DPDPE] et [le temps]. Cette analyse montre une interaction entre les 2 facteurs ([traitement DPDPE] x [temps] ; ((F(7,95) = 5,963 ; p < 0,001). Plus précisément, elle révèle que l'infusion striatale de DPDPE (10 μ M) pendant une période de 20 min dans le striatum d'animaux lésés 2 jours plus tôt par le L- α AA et perfusés avec de la glutamine (2,5 mM) produit, 40 min plus tard, une augmentation

significative des taux de glutamate dans les dialysats (+ 48,5 % ; $p < 0,01$; $n = 6$) qui atteint son point culminant après 60 min (+ 64,8 % ; $p < 0,001$; $n = 6$) et persiste jusqu'au terme de l'expérience (Figure 41).

L'infusion striatale de glutamine (2,5 mM) augmente les concentrations extracellulaires de glutamate dans le striatum d'animaux soumis, 2 jours auparavant, à une lésion des cellules gliales par injection intra-striatale de L- α AA. En accord avec ce résultat, Rothstein & Tabakoff (1984) ont montré, à partir de coupes striatales, que l'ajout de glutamine au milieu de perfusion prévient totalement l'inhibition de la libération Na^+ -dépendante de glutamate produite par un inhibiteur de la GS (la MSO). De même, Szerb & O'Regan (1985) ont indiqué que la glutamine provoque, de manière dépendante du Na^+ et sensible à la TTX, une forte augmentation des taux extracellulaires de glutamate. Plus récemment, Kam & Nicoll (2007) ont, par ailleurs, confirmé que l'ajout de glutamine au milieu environnant des neurones en culture provoque une forte augmentation de la transmission glutamatergique. Conjointement, ces résultats confirment les nombreuses études démontrant que la glutamine constitue le principal précurseur du glutamate neurotransmetteur (Bradford et coll., 1978 ; Lieth et coll., 2001 ; Sibson et coll., 2001 ; Waagepetersen et coll., 2005) et soulignent son rôle clé dans le maintien de la neurotransmission glutamatergique (*cf.* chapitre précédent). De manière intéressante, l'ajout de glutamine au milieu de perfusion augmente les taux extracellulaires de glutamate dans le striatum d'animaux lésés par le L- α AA à un niveau supérieur à celui observé chez des animaux témoins. Il est probable que ce résultat reflète une importante destruction des cellules gliales dans l'environnement immédiat de la sonde, altérant fortement les capacités de capture du glutamate qui, dans les conditions physiologiques, maintiennent le glutamate extracellulaire à une faible concentration (Jabaudon et coll., 1999).

Nous montrons que l'infusion continue de glutamine restaure également l'effet stimulant de la DPDPE sur les taux extracellulaires de glutamate évalués dans le striatum d'animaux lésés

par le L- α AA. Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle l'absence d'effet de la DPDPE observé, dans le striatum d'animaux lésés par le L- α AA, pourrait refléter une déficience des neurones glutamatergiques provoquée par une carence prolongée en glutamine. Ces données écartent, par conséquent, l'hypothèse d'une implication sélective des cellules gliales dans la libération striatale de glutamate induite par la DPDPE.

4.2.6 EFFET D'UNE INFUSION INTRA-STRIATALE DE DPDPE SUR LES TAUX EXTRACELLULAIRES DE DOPAMINE DEUX JOURS APRÈS INJECTION DE L- α AA

Les effets de la DPDPE sur les concentrations extracellulaires de dopamine évaluées chez des animaux ayant reçu 2 jours plus tôt une injection intra-striatale de L- α AA sont également étudiés en absence ou en présence de glutamine.

4.2.6.1 MILIEU DÉPOURVU DE GLUTAMINE

Dans les conditions de base, les concentrations de dopamine, évaluées à partir des 3 premiers dialysats collectés, sont stables dans chaque groupe avant le traitement par la DPDPE (Figure 42) et ne sont pas modifiées dans le striatum ipsilatéral d'animaux lésés ($45,2 \pm 7,8$ fmol/min vs. $46,1 \pm 6,7$ fmol/min pour le groupe témoin ; $t = 1,310$; $p > 0,05$; $n = 16$ et 32 respectivement).

Une ANOVA à 3 facteurs, effectuée à partir des données exprimées en % des concentrations basales de dopamine, avec [la lésion par le L- α AA], [le traitement par la DPDPE] et [le temps] comme facteurs, révèle une interaction entre les facteurs [traitement DPDPE] et [lésion L- α AA] ($F(1,255) = 5,920$; $p = 0,016$). Plus précisément, une ANOVA à 2 facteurs et à mesures répétées indique que l'infusion de DPDPE ($10 \mu\text{M}$) sur une période de 20 min produit, chez les animaux témoins, une augmentation significative des taux de dopamine

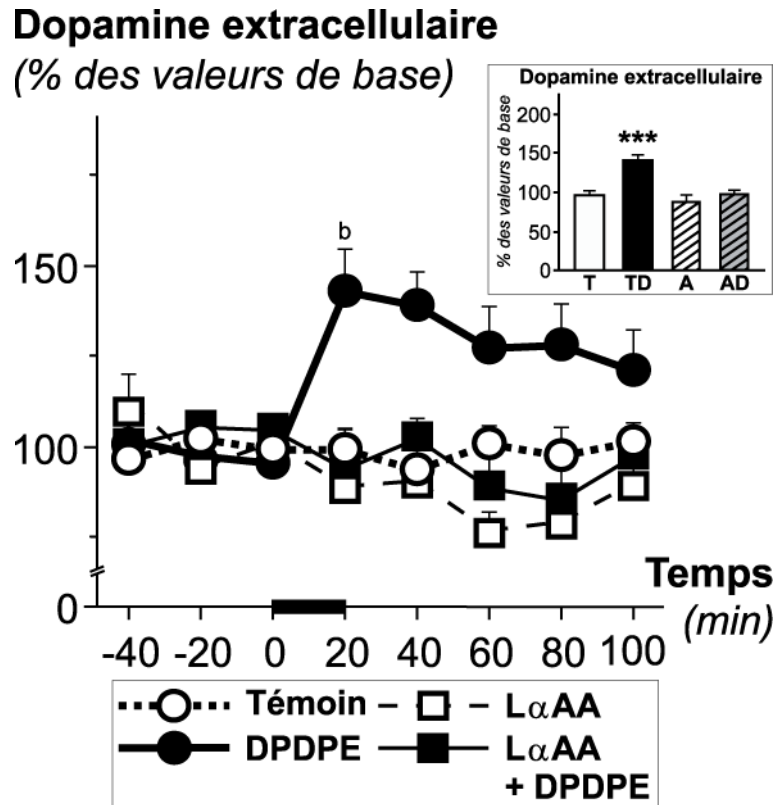


Figure 42 : Effet de la DPDPE sur les concentrations de dopamine dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis ou non, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L- α AA.

Avant l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, les animaux sont soumis ou non à une injection intra-striatale et ipsilatérale de L- α AA (200 μ g dans 5 μ L ; 0,5 μ L/min). Deux jours plus tard, une sonde est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer au débit de 1,0 μ L/min. Après une période d'équilibration de 2 heures, les dialysats sont successivement collectés toutes les 20 min et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en dopamine. Les 3 premiers échantillons, utilisés pour déterminer la libération basale de dopamine, sont suivis, pendant 20 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais), par l'infusion de DPDPE (10 μ M). La concentration basale de dopamine dans les dialysats, mesurée au cours de la collecte des 3 premiers échantillons, est de $46,1 \pm 6,7$ fmol/min chez les animaux témoins (n = 32) vs. $45,2 \pm 7,8$ fmoles/min pour les animaux ayant subi l'injection intra-striatale de L- α AA (n = 16 ; t = 1,310 ; p = 0,192). Les données sont exprimées en % de la libération basale de dopamine. Les moyennes \pm S.E.M. de 8 animaux par groupe sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. (b) P < 0,01 vs. groupe témoin (n = 8). L'insert illustre la libération moyenne de dopamine évaluée pendant les 60 min suivant le début du traitement chez les animaux témoins (T) ou lésés au L- α -AA (A) ainsi que chez les animaux témoins (TD) ou lésés au L- α -AA (AD) et soumis à l'infusion intra-striatale de DPDPE. *** P < 0,001 vs. groupe témoin (n = 8).

(interaction [traitement DPDPE] x [temps] ; F(7,127) = 3,645 ; p = 0,002) dans les 2 dialysats suivant le début du traitement, alors qu'elle reste sans effet chez des animaux ayant préalablement subi une injection intra-striatale de L- α AA ([traitement DPDPE] x [temps] ; F(7,127) = 0,745 ; p > 0,05). La DPDPE augmente les taux de dopamine dans les échantillons de microdialyse de 42,7 % (p < 0,001 ; n = 8) 20 min après son infusion dans le striatum

d'animaux témoins et les concentrations de dopamine retrouvent un niveau similaire à celui de la ligne de base après 60-80 min. Cependant, la lésion striatale induite, deux jours plus tôt, par le L- α AA conduit à une abolition de cet effet stimulant induit par la DPDPE sur la libération de dopamine (Figure 42).

De même, une ANOVA à 2 facteurs, réalisée à partir des aires sous la courbe, confirme l'interaction significative entre les facteurs [lésion L- α AA] et [traitement DPDPE] ($F(1,31) = 7,238$; $p = 0,012$), indiquant que l'augmentation des concentrations de dopamine induite par la DPDPE (+ 46,3 % ; $p < 0,001$; $n = 8$; insert de la Figure 42) est prévenue par l'injection intra-striatale de L- α AA.

La lésion des cellules gliales induite 2 jours après l'injection striatale de L- α AA abolit totalement l'effet stimulant de la DPDPE sur les concentrations extracellulaires de dopamine. Comme l'indiquent les expériences précédentes, cette lésion prévient également l'augmentation des taux extracellulaires de glutamate. Ce résultat corrobore donc nos expériences de lésions corticales indiquant que la libération de dopamine résultant d'une stimulation des récepteurs opioïdes δ est la conséquence d'une libération de glutamate (*cf.* première partie des résultats). Pour vérifier une nouvelle fois cette hypothèse, nous avons ensuite recherché si l'ajout de glutamine dans le milieu de perfusion permet de restaurer l'effet stimulant, préalablement aboli par la lésion des cellules gliales, de la DPDPE sur la libération striatale de dopamine.

4.2.6.2 MILIEU ENRICHI EN GLUTAMINE

L'infusion striatale de glutamine (Figure 43) provoque, par rapport aux concentrations de base, une augmentation des concentrations extracellulaires de dopamine chez des animaux ayant subi, 2 jours plus tôt, une lésion des cellules gliales par injection intra-striatale de L-

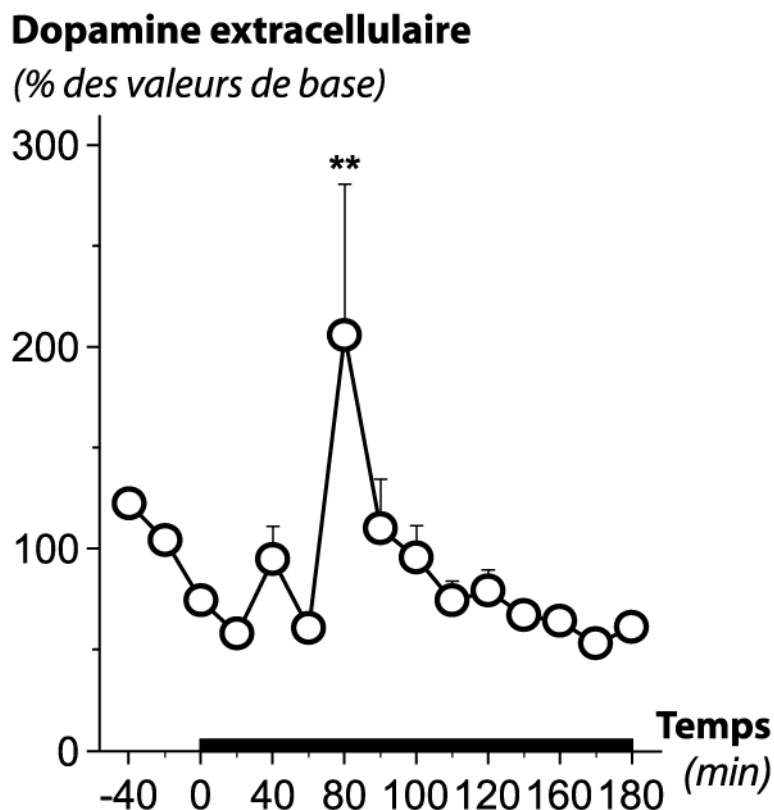


Figure 43 : Effet de la glutamine sur les concentrations de dopamine dans les dialysats collectés à partir du striatum chez des animaux soumis, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L- α AA.

Avant l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, les animaux sont soumis à une injection intra-striatale et ipsilatérale de L- α AA (200 μ g dans 5 μ L ; 0,5 μ L/min). Deux jours plus tard, une sonde est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer au débit de 1,0 μ L/min. Après une période d'équilibration de 2 heures, les dialysats sont successivement collectés toutes les 20 min et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en dopamine. Les 3 premiers échantillons, utilisés pour déterminer la libération basale de dopamine, sont suivis d'une infusion continue de glutamine (2,5 mM ; portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais). La concentration basale de dopamine dans les dialysats, mesurée au cours de la collecte des 3 premiers échantillons est de $47,0 \pm 6,7$ fmol/min). Les données sont exprimées en % de la libération basale de dopamine. Les moyennes \pm S.E.M. de 3 animaux par groupe sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées suivie par un test de Tukey. ** P < 0,01 vs. concentrations basales (n = 3).

α AA. Une ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées est effectuée à partir des valeurs exprimées en % des taux de base de dopamine, avec [le temps] comme facteur. Cette analyse démontre que l'infusion de glutamine (2,5 mM) provoque, en fonction du temps, une augmentation significative des taux de glutamate ($F(14,44) = 4,004$; $p < 0,001$). Plus précisément, elle révèle que l'infusion continue de glutamine (2,5 mM) sur une période de 180 min produit à 80 min une augmentation transitoire et significative des concentrations de dopamine ($96,2 \pm 24,2$ fmol/min vs. $47,0 \pm 6,7$ fmol/min ; + 104,8 % ; $p = 0,003$; n = 3). Les

taux de dopamine mesurés dans les dialysats rejoignent les valeurs de base à partir de 100 min après le début du traitement ($50,3 \pm 3,8$ fmol/min vs. $47,0 \pm 6,7$ fmol/min ; $p > 0,05$; $n = 3$; Figure 43).

Deux heures après l'ajout de glutamine (2,5 mM) dans le milieu de microdialyse, les concentrations de dopamine dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis 2 jours plus tôt à une lésion par le L- α AA sont stables (Figure 44, 3 premiers échantillons). Une analyse ANOVA à 2 facteurs est effectuée à partir des valeurs exprimées en % des taux de base de dopamine, avec comme facteurs [le traitement par la DPDPE] et [le temps]. Cette analyse démontre une interaction entre les 2 facteurs ([traitement DPDPE] x [temps] ; ((F(7,95) = 5,963 ; $p < 0,001$). Plus précisément, elle révèle que l'infusion striatale de DPDPE (10 μ M) pendant 20 min, dans un milieu enrichi en glutamine (2,5 mM), produit 40 min plus tard une augmentation significative des taux de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux lésés, 2 jours plus tôt, par le L- α AA (+ 48,5 % ; $p < 0,01$; $n = 6$) qui atteint son point culminant après 60 min (+ 64,8 % ; $p < 0,001$; $n = 6$). Les concentrations extracellulaires de dopamine rejoignent les taux de base 80 min après le début du traitement par la DPDPE (Figure 44).

À l'instar des résultats obtenus pour le glutamate, la perfusion intra-striatale de glutamine augmente les taux extracellulaires de dopamine. Bien que de manière indirecte, ce résultat confirme les études indiquant que le glutamate extracellulaire, dépendant lui-même de la présence de glutamine, stimule de manière tonique la libération de dopamine (Giorgiueff-Chesselet et coll., 1979 ; Westerink et coll., 1989b ; Wang 1991). Cependant, alors que la glutamine provoque une augmentation continue des concentrations de glutamate dans les dialysats, celle-ci n'est que transitoire pour la dopamine. Cette incohérence reflète probablement une incapacité du système de neurotransmission glutamatergique à maintenir, en réponse à une perfusion de glutamine, les concentrations extracellulaires de glutamate à un

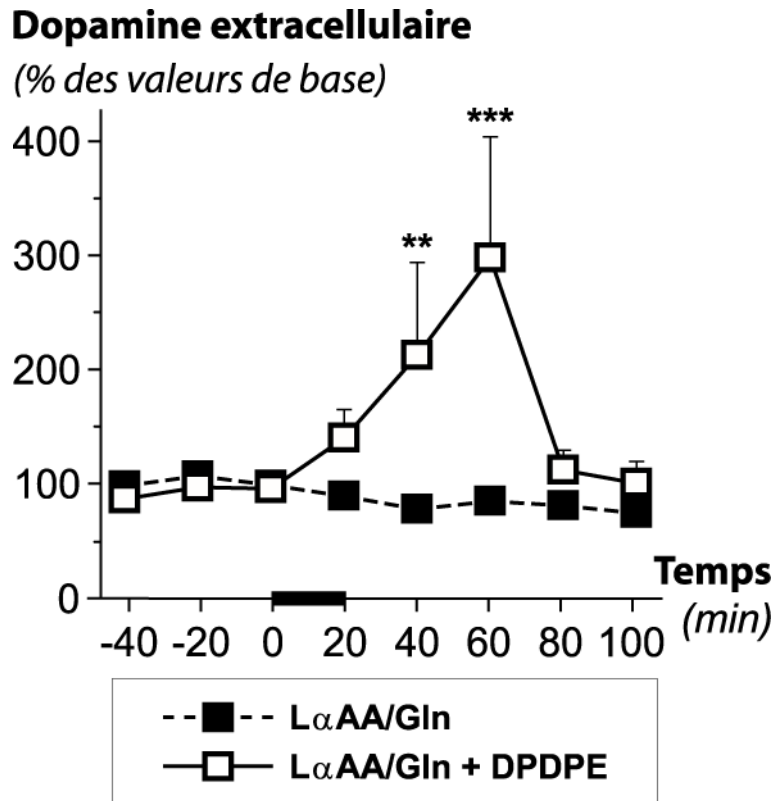


Figure 44 : Effet de la DPDPE, en présence de glutamine, sur les concentrations de dopamine dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L- α AA.

Avant l'implantation d'une canule-guide dans le striatum droit, les animaux sont soumis à une injection intra-striatale et ipsilatérale de L- α AA (200 μ g dans 5 μ L ; 0,5 μ L/min). Deux jours plus tard, une sonde est insérée dans la canule et perfusée avec une solution de Ringer contenant 2,5 mM de glutamine, au débit de 1,0 μ L/min. Après une période d'équilibration de 2 heures, les dialysats sont successivement collectés toutes les 20 min et analysés par HPLC afin d'évaluer leur contenu en dopamine. Les 3 premiers échantillons, utilisés pour déterminer la libération basale de dopamine, sont suivis, pendant 20 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais), par l'infusion de DPDPE (10 μ M). La concentration basale de dopamine dans les dialysats, mesurée au cours de la collecte des 3 premiers échantillons, est similaire dans les 2 groupes avec une valeur moyenne de $48,7 \pm 6,9$ fmol/min. Les données sont exprimées en % de la libération basale de dopamine. Les moyennes \pm S.E.M. de 6 animaux par groupe sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. ** P < 0,01 et *** P < 0,001 vs. groupe témoin (n = 6).

niveau physiologique dans un environnement dépourvu de cellules gliales tandis que les neurones dopaminergiques, dont l'intégrité fonctionnelle n'est pas altérée par le L- α AA, semblent avoir gardé cette faculté d'adaptation. En effet, alors que les paramètres neurochimiques relevant du système de transmission glutamatergique, qui sont tous affectés par la lésion induite par le L- α AA (diminution de la capture synaptosomale ainsi que des concentrations tissulaire et extracellulaire), suggèrent une forte altération des capacités

fonctionnelles de ce dernier, tous les index du système dopaminergique indiquent, au contraire, une préservation de la fonctionnalité des neurones nigro-striataux. La perfusion continue de glutamine restaure également les effets stimulants de la DPDPE sur les taux extracellulaires de dopamine. De manière similaire, ce résultat confirme nos expériences de lésions corticales indiquant que la libération de dopamine induite par la DPDPE nécessite la présence de terminaisons glutamatergiques pleinement fonctionnelles. De plus, l'effet restaurateur de la glutamine suggère que la libération de dopamine induite par les récepteurs opioïdes de type δ n'implique pas directement les cellules gliales.

4.2.7 EFFETS DE LA DPDPE SUR LES TAUX EXTRACELLULAIRES DE GLUTAMATE ÉVALUÉS EN PRÉSENCE D'UN INHIBITEUR SÉLECTIF DE LA CAPTURE DE GLUTAMATE ET SUR LA CAPTURE SYNAPTOSOMALE DE [³H]-L-GLUTAMATE

Les résultats obtenus précédemment avec le L- α AA indiquent, à la période post-lésionnelle la plus tardivement explorée, que l'augmentation des taux extracellulaires de glutamate et de dopamine induite par la DPDPE est indépendante d'un mécanisme de signalisation cellulaire impliquant spécifiquement les cellules gliales. Les expériences dans lesquelles les effets du L- α AA ont été utilisés de manière précoce nous ont, en outre, permis d'exclure plus précisément une implication de processus gliaux tels que la capture de glutamate et l'échange cystine/glutamate. Comme l'échange résultant de l'activité de X_C^- (Pow, 2001), le transport du glutamate est généralement considéré comme un processus majoritairement glial (*pour revue* : Danbolt, 2001). Néanmoins, des données récentes suggèrent qu'une forme variante de transporteur EAAT2 pourrait être responsable de la capture présynaptique du glutamate dans le cortex, le thalamus et l'hippocampe (Schmitt et coll., 2001 ; Chen et coll., 2002 ; Chen et coll., 2004). Nous avons, dans cette dernière partie, déterminé l'influence d'un inhibiteur sélectif de la capture de glutamate, l'acide L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylique (PDC), sur

l'effet stimulant induit par la DPDPE au niveau des taux extracellulaires de glutamate. Dans un second temps, nous avons recherché, à partir de préparations synaptosomales, si la DPDPE est capable d'exercer un effet inhibiteur sur les taux de capture du glutamate.

Dans les conditions de base, les taux extracellulaires de glutamate, évalués à partir des 3 premiers dialysats collectés, sont stables dans chaque groupe avant l'infusion intra-striatale de PDC seul ou de PDC et de DPDPE (Figure 45A). De manière significative, l'infusion de PDC (2 mM) pendant 20 min provoque, 40 min plus tard, une augmentation des concentrations de glutamate dans les dialysats de 56,2 % ($p = 0,033$; $n = 9$) alors que la co-infusion de PDC (2 mM) et de DPDPE (10 μ M) induit une augmentation de ces concentrations de 105,3 % ($p < 0,001$; $n = 9$; Figure 45A). En effet, une ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées, avec [le traitement par la DPDPE] et [le temps] comme facteurs, indique chez les animaux traités par le PDC une interaction entre les facteurs [traitement DPDPE] et [temps] et révèle que la co-infusion de PDC (2 mM) et de DPDPE (10 μ M) produit une augmentation significativement plus importante que celle induite par l'administration du PDC seul, aussi bien dans le premier ($F(7,143 = 2,406$; $p = 0,014$) que dans le second échantillon ($F(7,143 = 2,406$; $p = 0,007$) suivant le début des traitements. L'ANOVA à 2 facteurs, effectuée à partir des valeurs cumulées (aires sous la courbe pour les 2 échantillons collectés après le début du traitement), confirme que l'augmentation des taux de glutamate induite par le PDC (+ 42,6 %) diffère significativement de celle induite par la co-infusion de PDC et de DPDPE (+ 89,6 % ; $p = 0,011$; $n = 9$; insert de la Figure 45A). Ainsi, l'effet stimulant provoqué par la DPDPE sur les taux de glutamate est maintenu en présence d'un inhibiteur de capture du glutamate.

Par ailleurs, les expériences de capture de [3 H]-L-glutamate effectuées *in vitro*, à partir de synaptosomes striataux, révèlent que le PDC provoque une inhibition dose dépendante de cette capture, avec une IC_{50} de $11,7 \pm 0,6$ μ M (Figure 45B). En revanche, la DPDPE, à la dose

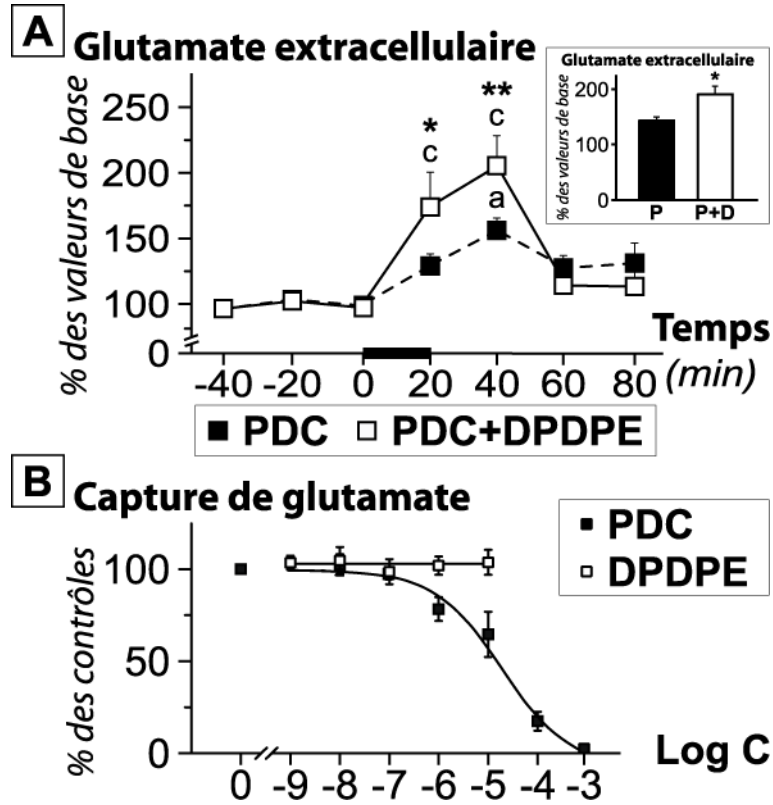


Figure 45 : Effet de l'acide L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylique (PDC) sur la libération de glutamate induite par la DPDPE et effet de la DPDPE sur la capture synaptosomale de glutamate.

A) Après une période d'équilibration de 2 heures, des dialysats successifs de 20 μ L sont collectés et analysés par HPLC pour déterminer leur contenu en glutamate. Les 3 premiers échantillons, utilisés pour déterminer la libération basale de glutamate, sont suivis par l'infusion de PDC (2 mM) ou par la co-infusion de PDC (2 mM) et de DPDPE (10 μ M) pendant 20 min (portion de l'axe des abscisses matérialisée par un segment noir épais). Les concentrations basales de glutamate dans les dialysats, mesurées au cours de la collecte des 3 premiers échantillons, sont de $22,6 \pm 6,5$ pmol/min pour le groupe d'animaux traités au PDC (n = 9) vs. $19,1 \pm 2,9$ pmol/min pour le groupe de rats soumis au traitement PDC + DPDPE (n = 9). Les données sont exprimées en % des concentrations basales de glutamate. Les moyennes \pm S.E.M. de 9 animaux par groupe sont comparées au moyen d'une ANOVA à 2 facteurs et à mesures répétées suivie par un test de Tukey. ** P < 0,01 ; * P < 0,05 vs. groupe PDC. a : P < 0,05 ; c : P < 0,001 par rapport à la ligne de base. L'insert illustre la libération moyenne de glutamate évaluée au cours des 40 min suivant l'infusion de PDC (P) ou la co-infusion de PDC et de DPDPE (P+D). * P < 0,05 ; n = 9. B) La capture de [3 H]-L-glutamate (4 nM) est réalisée pendant 5 min à partir de synaptosomes striataux, en présence de PDC (concentration finale de 10 nM à 1 mM) ou de DPDPE (concentration finale de 1 nM à 10 μ M). Les données sont exprimées en % de la capture de [3 H]-L-glutamate mesurée dans les conditions contrôles ($1,49 \pm 0,05$ pmol/mg de protéines). Les résultats correspondent aux moyennes \pm S.E.M. obtenues à partir de 3 expériences.

maximale utilisée dans les expériences de microdialyse (10 μ M), n'a aucun effet sur le taux de capture synaptosomale de glutamate.

Le PDC, substrat et inhibiteur des transporteurs du glutamate (Koch et coll., 1999), est généralement considéré comme l'inhibiteur de capture du glutamate de référence (Brigdes &

Esslinger, 2005). Nos résultats montrent que son infusion intra-striatale augmente la concentration extracellulaire de glutamate et confirment ainsi les études de microdialyse ayant observé un effet similaire (Herrera-Marschitz et coll., 1996 ; Rawls & McGinty, 1997 ; Montiel et coll., 2005). L'infusion simultanée de PDC et de DPDPE provoque, comparativement au PDC seul, un effet additif sur les taux extracellulaires de glutamate. Par ailleurs, la DPDPE ne présente aucun effet propre sur la capture de glutamate comme en attestent les expériences de capture synaptosomale. Conjointement, ces résultats excluent donc la possibilité que la libération de glutamate induite par la DPDPE puisse refléter une altération de la capture de glutamate, qu'elle soit gliale ou neuronale.

Cette seconde partie d'expériences confirme nos précédents résultats, indiquant que la stimulation des récepteurs opioïdes δ augmente la libération striatale de glutamate laquelle, à son tour, induit celle de dopamine. Nos résultats montrent, en outre, que cette succession d'évènements nécessite la présence de cellules gliales fonctionnelles, à défaut desquelles les terminaisons glutamatergiques ne sont plus suffisamment approvisionnées en glutamine pour maintenir leur capacité à libérer du glutamate en réponse à une stimulation des récepteurs opioïdes de type δ . En revanche, le mécanisme par lequel la stimulation des récepteurs opioïdes de type δ induit la libération de glutamate dans le striatum ne semble pas directement impliquer les cellules gliales. En outre, ce processus apparaît indépendant d'une éventuelle altération des capacités de capture de glutamate. Ces résultats nous permettent de proposer un mécanisme dans lequel la DPDPE pourrait initialement augmenter les taux extracellulaires de glutamate, selon un processus de libération probablement exocytotique et par l'intermédiaire de récepteurs opioïdes de type δ localisés au niveau même des terminaisons cortico-striatales. L'augmentation de la libération de dopamine induite par la DPDPE ne serait alors qu'une conséquence de cet effet.

PARTIE 3

4.3 RÔLE DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ DANS LES MOUVEMENTS DYSKINÉTIQUES INDUITS PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT « HÉMI-PARKINSONNIEN »

Les deux premières parties de notre étude, consacrées aux aspects neurochimiques des effets induits par les récepteurs opioïdes δ striataux, ont révélé que l'augmentation de la libération striatale de dopamine qui résulte de la stimulation de ces derniers est, en fait, la conséquence d'une libération striatale de glutamate, à partir des terminaisons des neurones cortico-striataux et selon un mécanisme indépendant des cellules gliales. Les neurones originaires du cortex représentent la principale innervation striatale, la seconde étant constituée par les neurones originaires de la substance noire (pars compacta). Les terminaisons de ces neurones forment des synapses au contact des neurones GABAergiques qui, à leur tour, projettent directement vers la partie interne du globus pallidus (GPi) et la substance noire pars reticulata (SNr) ou de manière indirecte via la partie externe du globus pallidus (GPe). L'équilibre entre les niveaux d'activité des projections striato-pallidales directe et indirecte est généralement considéré comme indispensable pour permettre aux ganglions de la base d'assurer leur fonction de chef d'orchestre du comportement moteur. Ainsi, le déséquilibre créé par la dégénérescence des neurones striato-pallidiaux de la voie indirecte est à l'origine des troubles moteurs hyperkinétiques qui caractérisent la maladie de Huntington. En revanche, les troubles moteurs hypokinétiques associés à la maladie de Parkinson résultent du déséquilibre provoqué par la dégénérescence des neurones nigro-striataux, en raison de l'expression différentielle des récepteurs dopaminergiques de type D₁ et D₂. De manière intéressante, de nombreuses études ont suggéré une implication des peptides opioïdes endogènes et de leurs récepteurs dans la physiopathologie la maladie de Parkinson. En ce qui concerne plus particulièrement les récepteurs opioïdes de type δ , plusieurs études autoradiographiques ont ainsi constaté une diminution du taux de radiolisation de la [³H]-DPDPE dans le striatum ipsilatéral de rats

préalablement soumis à une déafférentation dopaminergique unilatérale (Trovero et coll., 1990 ; Smith et coll., 1993 ; Johansson et coll., 2001). Bien que, chez le Rat, Dilts & Kalivas (1990) n'aient pas réussi à mettre en évidence cette diminution des récepteurs opioïdes de type δ dans le striatum ipsilatéral après lésion unilatérale des neurones nigro-striataux, une réduction du nombre de récepteurs δ a été observée, *post mortem*, chez le patient parkinsonien (Fernandez et coll., 1994). Ces résultats ont été initialement interprétés comme la preuve d'une localisation présynaptique des récepteurs δ au niveau des terminaisons dopaminergiques, mais cette hypothèse a été réfutée par des études structurelles plus précises indiquant que les terminaisons nigro-striatales apparaissent dépourvues de récepteurs δ (Le Moine et coll., 1994 ; Mansour et coll., 1994 ; Guttenberg et coll., 1996). En accord avec cette notion, Smith et coll. (1993) ont indiqué que l'expression de l'ARNm codant les récepteurs δ n'est pas altérée dans le cas de lésions unilatérales et partielles (< 90 %) des neurones nigro-striataux alors que ces dernières provoquent néanmoins une importante déafférentation dopaminergique. Ainsi, les diminutions d'expression des récepteurs δ observées dans le striatum ipsilatéral après lésion des neurones dopaminergiques sont généralement interprétées comme le reflet de mécanismes postsynaptiques compensatoires qui pourraient, par exemple, résulter d'une libération accrue des peptides opioïdes. Le traitement par la L-DOPA constitue la stratégie thérapeutique la plus fréquemment utilisée pour améliorer les symptômes de la maladie de Parkinson. Cette médication souffre, en revanche, d'imperfections car elle provoque au long cours des effets indésirables chez la majorité des patients, caractérisés par l'apparition de divers mouvements involontaires et anormaux. Récemment, Henry et coll. (2001) ont suggéré que les récepteurs δ pourraient constituer une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des troubles moteurs induits par la L-DOPA puisque, chez le Singe, ils sont réduits par le naltrindole, un antagoniste de ces récepteurs. Ces données nous ont incités à rechercher quelles pourraient être les implications fonctionnelles imputables aux

récepteurs opioïdes δ striataux, dans un système qui nous permettrait de valider ou non les hypothèses résultant de nos études neurochimiques. Le modèle des dyskinésies induites par le traitement par la L-DOPA nous est apparu particulièrement adapté à cet objectif. En effet, bien que la physiopathologie des mouvements involontaires anormaux demeure assez mal connue, des hypothèses dopaminergique et glutamatergique ont été avancées pour rendre compte des mouvements dyskinétiques induits par la L-DOPA chez des sujets parkinsoniens (*pour revue* : Brotchie et coll., 2005). Nous avons ainsi consacré la dernière partie de notre étude à étudier les effets des récepteurs δ opioïdes sur les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le Rat « hémi-parkinsonien ».

4.3.1 VALIDATION DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL DE LÉSION DU FAISCEAU MÉDIAN DU TÉLENCÉPHALE PAR INJECTION D'HYDROXY-6-DOPAMINE

Dans cette partie de notre étude, nous avons utilisé le modèle du rat « hémi-parkinsonien » obtenu par injection unilatérale d'hydroxy-6-dopamine (6-OHDA) dans le faisceau médian du télencéphale (MFB). La 6-OHDA est un composé neurotoxique, dérivé de la dopamine, qui induit la dégénérescence des neurones catécholaminergiques et qui constitue, chez le rongeur, le principal modèle expérimental de la maladie de Parkinson (Ungerstedt, 1971a ; Schwarting & Huston, 1996 ; Deumens et coll., 2002), dont il reproduit assez fidèlement les troubles moteurs (Cenci et coll., 2002). La toxine est généralement injectée au niveau de la substance noire pars compacta (SNc), du striatum ou du MFB. Les injections dans le MFB semblent néanmoins mieux adaptées au modèle expérimental des dyskinésies induites par la L-DOPA, modèle qui requiert une dégénérescence massive des neurones dopaminergiques (Winkler et coll., 2002). En outre, les lésions unilatérales sont souvent privilégiées aux injections bilatérales qui entraînent un taux de mortalité important (Ungerstedt, 1971b) et sont dépourvues de l'asymétrie comportementale permettant d'évaluer l'efficacité de la lésion

grâce aux tests des rotations pharmacologiquement induites. Dans un premier temps, nous avons cherché à valider ce modèle dans nos conditions expérimentales, en étudiant l'impact d'une telle lésion au niveau neurochimique et comportemental.

4.3.1.1 ANALYSE NEUROCHIMIQUE DE L'AMPLEUR DE LA LÉSION AU NIVEAU STRIATAL

Les analyses neurochimiques indiquent que, 2 semaines après la lésion unilatérale du MFB par injection de 6-OHDA, le taux de capture synaptosomale de dopamine dans le striatum ipsilatéral est significativement réduit comparativement au striatum contralatéral (respectivement $8\,489 \pm 2\,045$ fmol/mg de protéines vs. $14\,227 \pm 1\,607$ fmol/mg de protéines ; - 40,3 % ; $t = 2,191$; $p < 0,05$). De manière similaire, le contenu tissulaire en dopamine dans le striatum ipsilatéral à la lésion est significativement réduit par rapport au striatum contralatéral (respectivement $0,44 \pm 0,11$ nmol/mg de protéines vs. $0,97 \pm 0,11$ nmol/mg de protéines ; - 54,6 % ; $t = 3,413$; $p < 0,01$). Un test statistique de Pearson révèle, en outre, que les taux de capture synaptosomale de dopamine et les concentrations tissulaires de dopamine, exprimées en % des rapports [valeur obtenue dans le striatum ipsilatéral]/[valeur dans le striatum contralatéral], sont positivement corrélés ($R^2 = 0,895$; $p < 0,001$; $n = 12$; Figure 46A). En revanche, les concentrations tissulaires de glutamate dans le striatum ipsilatéral ne sont pas altérées par la lésion ($63,11 \pm 8,46$ nmol/mg de protéines vs. $64,04 \pm 6,49$ nmol/mg de protéines ; $t = 0,0866$; $p > 0,05$).

Nos résultats indiquent que la lésion unilatérale du MFB par injection de 6-OHDA induit une diminution significative des concentrations striatales de dopamine (- 55 %). De même, la capture de dopamine est significativement réduite. Les taux de capture de dopamine sont, par ailleurs, considérés comme un index fiable de l'innervation dopaminergique car ils ne sont pas altérés par l'administration chronique d'un neuroleptique, l'halopéridol, ou d'un anti-

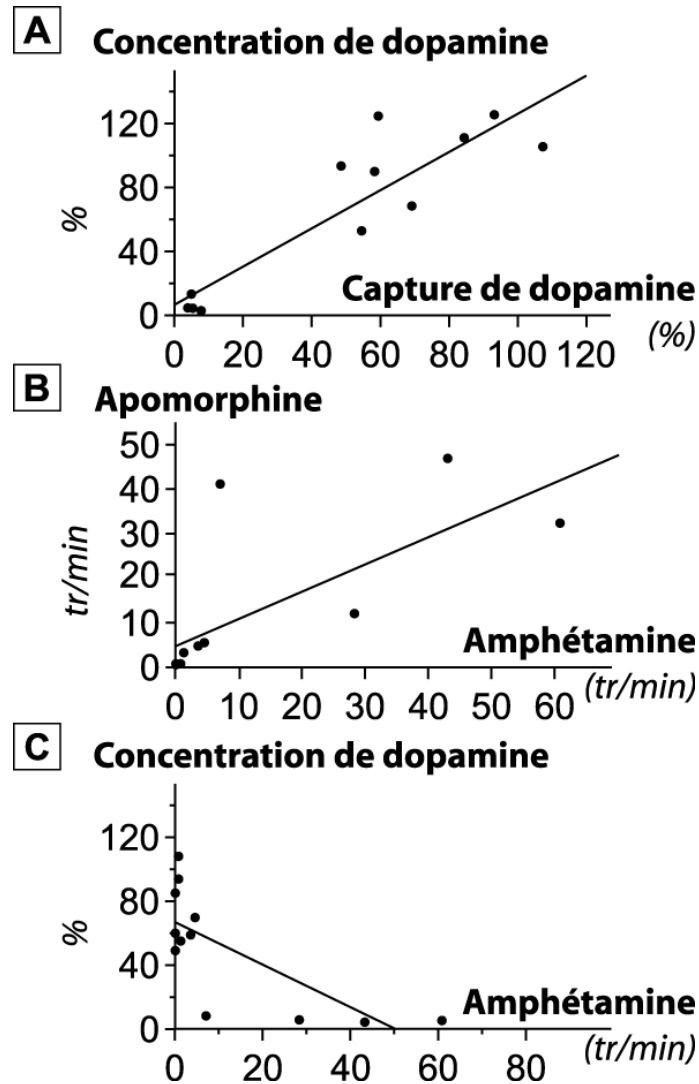


Figure 46 : Corrélations entre différents index comportementaux et neurochimiques 2 semaines après l'injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale.

Une solution de 4 μL contenant 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de 6-OHDA et 0,2 % d'acide ascorbique est injectée au niveau du MFB (A/P : - 3,8 mm ; M/L : - 1,5 mm ; D/V : - 8,5 mm par rapport à la dure mère et au bregma) au débit de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. (A) Deux semaines après la lésion, les animaux sont sacrifiés et leurs striata sont prélevés afin de préparer des synaptosomes destinés aux expériences de capture de dopamine ou dans le but de déterminer par HPLC leur contenu en dopamine. Les données issues de chaque expérience sont exprimées en % des rapports [valeur obtenue dans le striatum ipsilatéral]/[valeur obtenue dans le striatum contralatéral] et analysées grâce à un test de corrélation de Pearson qui révèle une corrélation positive entre les 2 facteurs ($R^2 = 0,895$; $p < 0,001$; $n = 12$). (B) Les animaux reçoivent une injection *i.p.* d'amphétamine (2,5 mg/kg) et leurs rotations dans le sens ipsilatéral à la lésion sont comptabilisées. Le lendemain, les mêmes animaux reçoivent une injection *i.p.* d'apomorphine (0,5 mg/kg) et leurs rotations contralatérales sont évaluées. Les données issues de chaque expérience sont analysées à l'aide d'un test de corrélation de Pearson qui révèle une corrélation positive entre les 2 facteurs ($R^2 = 0,709$; $p < 0,01$; $n = 12$). (C) Les concentrations striatales de dopamine (exprimées en % des rapports [valeur obtenue dans le striatum ipsilatéral]/[valeur obtenue dans le striatum contralatéral]) sont représentées en fonction des rotations induites par l'amphétamine. Une analyse statistique effectuée grâce à un test de Pearson révèle l'existence d'une corrélation négative entre les 2 paramètres ($R^2 = - 0,736$; $p < 0,01$; $n = 12$).

parkinsonien agoniste des récepteurs dopaminergiques D₂, la bromocriptine (Naudon et coll., 1995). Cependant, bien qu'escomptées, les réductions des concentrations et niveaux de capture de dopamine sont inférieures aux déficits dopaminergiques attendus après l'injection de 6-OHDA dans le MFB, laquelle entraîne généralement une dégénérescence massive des corps cellulaires des neurones dopaminergiques de la SNc et de l'aire tegmentale ventrale (ATV) (*pour revue* : Deumens et coll., 2002). La perte neuronale relativement faible que laissent supposer nos résultats suggère une efficacité modérée des injections unilatérales de 6-OHDA effectuées, dans le MFB, au cours de ces expériences préliminaires, puisque certains animaux apparaissent en effet épargnés par la lésion (Figure 46A). Ces résultats révèlent ainsi un problème de reproductibilité des injections opérées par guidage stéréotaxique dans le MFB qui requièrent une grande précision, en raison de la région anatomiquement restreinte où elles doivent être effectuées.

Deux semaines après la déafférentation dopaminergique, les contenus tissulaires de glutamate ne sont pas altérés dans le striatum ipsilatéral. Il nous est difficile de confronter ce résultat aux données de la littérature car, hormis l'augmentation des concentrations tissulaires de glutamate relatée par Lindfors & Ungerstedt (1990), la majorité des études concernent plutôt l'influence de la destruction des neurones nigro-striataux sur l'activité de la transmission glutamatergique. En accord avec l'effet inhibiteur exercé par la dopamine sur la libération striatale de glutamate (*pour revue* : Morari et coll., 1993), de nombreuses études, utilisant des techniques aussi variées que l'électrophysiologie, la microdialyse intracérébrale ou la microscopie électronique (Tossmann et coll., 1986 ; Lindfors & Ungerstedt, 1990 ; Calabresi et coll., 1993 ; Ingham et coll., 1998 ; Meshul et coll., 1999 ; Meshul et coll., 2000 ; Jonkers et coll., 2002), indiquent que la déplétion striatale en dopamine induite par la 6-OHDA augmente l'activité des neurones glutamatergiques du striatum ipsilatéral. Des modifications adaptatives, suggérant un accroissement de l'activité glutamatergique, ont par exemple été

observées au niveau des synapses glutamatergiques après déafférentation dopaminergique. En effet, une augmentation du nombre de synapses asymétriques, à densité postsynaptique discontinue ou perforée, a été démontrée dans le striatum ipsilatéral à la lésion nigro-striatale (Ingham et coll., 1998 ; Meshul et coll., 1999 ; Meshul et coll., 2000). L'efficacité et l'expression de ces synapses glutamatergiques, ainsi dénommées en raison de l'apparence en forme de fer-à-cheval qu'elles présentent par microscopie électronique, sont par ailleurs amplifiées dans les processus de potentialisation à long terme (*pour revue* : Jones & Harris, 1995). En ce qui concerne les concentrations extracellulaires de glutamate, certains auteurs ont constaté leur augmentation dans le striatum ipsilatéral, 3 (Jonkers et coll., 2002) ou 4 semaines (Tossmann et coll., 1986 ; Lindfors & Ungerstedt, 1990) après la destruction des neurones dopaminergiques nigro-striataux, alors que d'autres études n'ont mis en évidence aucune augmentation de ces concentrations après 2 (Corsi et coll., 2003), 3 (Robelet et coll., 2004) ou 4 semaines (Galeffi et coll., 2003). L'interprétation initialement retenue pour rendre compte de cette dissonance s'appuie sur le délai postlésionnel qui varie d'une étude à une autre. En effet, Meshul et coll. (1999) ont montré que les taux extracellulaires de glutamate sont augmentés 1 mois après la lésion induite par la 6-OHDA mais qu'ils sont au contraire diminués au bout de 3 mois, suggérant par ailleurs que les mécanismes compensatoires responsables de l'augmentation des taux extracellulaires de glutamate sont indépendants de la concentration striatale de dopamine qui reste, dans le même temps, drastiquement réduite. Cette hypothèse est néanmoins discutable puisque des réponses contradictoires ont été observées à des temps postlésionnels identiques. Ces résultats discordants pourraient, toutefois, refléter des différences au niveau d'autres paramètres comme le site d'administration de la 6-OHDA, dans la SNc (Robelet et coll., 2004) ou le MFB (Tossmann et coll., 1986 ; Lindfors & Ungerstedt, 1990 ; Meshul et coll., 1999 ; Jonkers et coll., 2002 ; Corsi et coll., 2003 ; Galeffi et coll., 2003), l'étendue et la topographie de la dénervation

dopaminergique qui en résulte et/ou l'administration (Tossmann et coll., 1986 ; Lindfors & Ungerstedt, 1990 ; Meshul et coll., 1999 ; Corsi et coll., 2003) ou non (Jonkers et coll., 2002 ; Galeffi et coll., 2003 ; Robelet et coll., 2004) d'un agoniste dopaminergique pour évaluer l'efficacité de la lésion. Nos résultats paraissent cohérents avec les travaux de Tanaka et coll. (1986), indiquant que les contenus tissulaires de glutamate ne sont pas altérés 1 mois après l'injection unilatérale de 6-OHDA dans le MFB, mais ils sont néanmoins difficiles à comparer aux données relatives aux concentrations extracellulaires de glutamate. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, les concentrations tissulaires de glutamate ne constituent pas un index fiable de l'activité des neurones glutamatergiques.

Nos analyses des principaux paramètres neurochimiques représentatifs des transmissions glutamatergique et dopaminergique striatales indiquent donc que, 15 jours après l'injection unilatérale de 6-OHDA dans le MFB, la déafférentation nigro-striatale préserve les contenus tissulaires en glutamate et, de manière attendue, réduit les concentrations tissulaires et taux de capture de dopamine. Ces deux derniers paramètres étant positivement corrélés, nous avons fait le choix, dans nos expériences ultérieures, de privilégier les dosages par HPLC des concentrations striatales de dopamine, réduisant ainsi l'utilisation des ligands radioactifs nécessaires aux expériences de capture synaptosomale.

4.3.1.2 ÉPREUVES COMPORTEMENTALES DES ROTATIONS INDUITES PAR L'AMPHÉTAMINE ET L'APOMORPHINE

L'efficacité de la lésion est évaluée d'un point de vue comportemental, par la mesure du nombre de rotations effectuées par les animaux après l'injection par voie *i.p.* d'une solution d'amphétamine (2,5 mg/kg) ou d'apomorphine (0,5 mg/kg). Comparativement à des animaux témoins, l'injection *i.p.* d'amphétamine provoque une augmentation significative du nombre de rotations dans le sens horaire (ipsilatéral à la lésion) chez les animaux hémiparkinsoniens

(respectivement $0,06 \pm 0,04$ vs. $12,48 \pm 5,87$ tr/min ; $t = - 2,114$; $p < 0,05$; $n = 12$). L'injection *i.p.* d'apomorphine provoque, par rapport à des animaux témoins, une augmentation significative des rotations effectuées dans le sens antihoraire (contralatéral à la lésion) par les animaux ayant subi la lésion unilatérale du MFB (respectivement $0,88 \pm 0,35$ vs. $12,44 \pm 5,97$ tr/min ; $t = - 2,321$; $p < 0,05$; $n = 12$). De plus, un test statistique de Pearson révèle que les rotations induites par l'amphétamine et par l'apomorphine sont positivement corrélées ($R^2 = 0,721$; $p < 0,01$; $n = 12$; Figure 46B). Par ailleurs, les concentrations striatales de dopamine s'avèrent corrélées négativement au nombre de rotations effectuées par les mêmes animaux après injection *i.p.* d'amphétamine ($R^2 = - 0,736$; $p < 0,01$; $n = 12$; Figure 46C).

Les rotations pharmacologiquement induites sont fréquemment utilisées comme indicateur de la perte neuronale chez les animaux ayant subi une déafférentation nigro-striatale par l'injection unilatérale de 6-OHDA. Selon le modèle décrit par Ungerstedt (1971a), l'administration d'un agoniste dopaminergique tel que l'apomorphine à un animal ayant subi une déafférentation nigro-striatale unilatérale induirait des rotations contralatérales en raison d'une hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques postsynaptiques au niveau du striatum ipsilatéral. À l'inverse, l'injection d'amphétamine engendrerait des rotations ipsilatérales en provoquant une libération de dopamine à partir des terminaisons dopaminergiques intactes du striatum contralatéral. Ces deux agents permettent ainsi d'évaluer l'intensité de la lésion induite par l'injection de 6-OHDA dans le MFB (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970). Cependant, certaines études indiquent que les rotations induites par les agonistes dopaminergiques apparaissent pour des niveaux de dénervation dopaminergique élevés alors que celles induites par l'amphétamine ont une meilleure sensibilité (Hefti et coll., 1980 ; Przedborski et coll., 1995 ; Lee et coll., 1996). On considère ainsi qu'une lésion des neurones dopaminergiques de l'ordre de 50 % au niveau de la SNc, correspondant dans le striatum à une réduction de la

densité en fibres dopaminergiques d'environ 90 %, est nécessaire pour induire des rotations après injection de faibles doses d'apomorphine (*pour revue* : Schwarting & Huston, 1996). Nos résultats ne valident cependant pas le concept d'une meilleure sensibilité du test des rotations induites par l'amphétamine comparativement à celui des rotations induites par l'apomorphine. En effet, l'administration *i.p.* d'amphétamine ou d'apomorphine à des rats ayant subi 15 jours plus tôt une injection unilatérale de 6-OHDA au niveau du MFB produit des rotations chez seulement la moitié des animaux alors que les 2/3 de ces animaux présentent, en terme de concentration tissulaire et de capture de dopamine, un taux de lésion supérieur à 50 % (Figure 46 A et B). À l'instar des résultats de nos analyses neurochimiques, ces données suggèrent une relativement faible efficacité des injections de 6-OHDA effectuées dans le MFB qui, là encore, est vraisemblablement imputable au niveau de précision que nécessitent ces injections stéréotaxiques (*cf.* chapitre précédent). Cette interprétation évoque ainsi la possibilité que la 6-OHDA ne puisse pas systématiquement atteindre le MFB, expliquant alors les réponses de type « tout ou rien » qui caractérisent nos expériences. Ces expériences préliminaires soulignent par conséquent l'intérêt que représentent les épreuves des rotations pharmacologiquement induites pour prédire, *in vivo*, l'efficacité de la lésion et permettre ainsi de ne sélectionner dans les expériences ultérieures que les animaux effectivement lésés, pour des raisons éthiques d'une part mais aussi compte tenu de la lourdeur de ces expériences (3 semaines de traitement chronique par la L-DOPA), et de répartir ces derniers de manière homogène dans les différents groupes (en fonction de leur taux de lésion). Nos résultats démontrant une corrélation positive entre ces deux types de comportements rotatoires, nous avons par la suite limité nos évaluations comportementales au seul test des rotations induites par l'amphétamine et les animaux effectuant moins de 1 tr/min ont par la suite été exclus de nos expériences.

4.3.2 ÉTUDE DES DYSKINÉSIES INDUITES PAR L'ADMINISTRATION CHRONIQUE DE L-DOPA CHEZ DES ANIMAUX PRÉALABLEMENT LÉSÉS PAR INJECTION UNILATÉRALE DE 6-OHDA DANS LE MFB

La L-DOPA constitue depuis les années 1960 le principal traitement de la maladie de Parkinson (Cotzias et coll., 1969). Contrairement à la dopamine, dont elle est le précurseur immédiat, la L-DOPA franchit la barrière hémato-encéphalique. Sa prise multi-quotidienne permet ainsi d'entretenir la synthèse de dopamine par la décarboxylation de la L-DOPA opérée par la DOPA décarboxylase. Néanmoins, ce traitement n'empêche pas la progression de la maladie et donne lieu, au long cours, à l'apparition de troubles hypo- ou hyperkinétiques respectivement représentés par des fluctuations motrices (détériorations de fin de dose et phénomènes « yo-yo ») et des mouvements involontaires anormaux (dyskinésies et dystonies). Ces effets indésirables de la « DOPA thérapie » peuvent concerner 45 à 85 % des patients parkinsoniens (*pour revues* : Brotchie et coll., 2005 ; Deogaonkar & Subramanian, 2005) mais leur apparition, leur nature et leur évolution sont en revanche très hétérogènes. Chez l'Homme, les mouvements involontaires induits par la L-DOPA sont essentiellement dyskinétiques et caractérisés par des dyskinésies dites de « pic de dose » et des dyskinésies biphasiques, l'influence du traitement dans l'apparition des phénomènes purement dystoniques (dystonies « off ») n'étant pas formellement établie (Martignoni et coll., 2003). Les dyskinésies du « pic de dose », qui sont de loin les plus fréquentes (Blanchet et coll., 1996), s'expriment lorsque la concentration plasmatique en L-DOPA est la plus forte et donc quand l'effet anti-parkinsonien est à son meilleur niveau. Elles sont principalement choréiformes (mouvements brefs et saccadés affectant principalement les membres) mais des mouvements d'origine dystonique (caractérisées par des contractions musculaires douloureuses et déformantes) peuvent également apparaître. Les dyskinésies biphasiques (D-1-D) surviennent au début et à la fin de l'effet anti-parkinsonien (lorsque les concentrations plasmatiques en L-DOPA sont en hausse ou en baisse) et sont généralement de nature

choréique et/ou dystonique. Chez le rat hémi-parkinsonien, les analyses comportementales révèlent que le traitement par la L-DOPA induit des mouvements involontaires de nature choréique qui reflètent de manière relativement fidèle l'expression des dyskinésies de pic de dose observées chez le patient parkinsonien (*pour revue* : Lane & Dunnett, 2007). L'administration chronique de L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien constitue donc un modèle expérimental de choix dans l'étude des mouvements involontaires et anormaux associés à la maladie de Parkinson.

4.3.2.1 CARACTÉRISTIQUES COMPORTEMENTALES DES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONIEN

Le traitement chronique par la L-DOPA (6 mg/kg + 15 mg/kg de benserazide) est effectué 2 semaines après l'injection unilatérale de 6-OHDA dans le MFB, sur une période de 3 semaines et à raison d'une injection quotidienne. Les analyses comportementales, réalisées 2 fois par semaine (2 jours consécutifs), débutent 20 min après l'injection. Les observations sont effectuées pendant 1 min, toutes les 20 min, sur une période totale de 3 heures. Au cours des 3 semaines de traitement, 48 % des animaux ont progressivement exprimé des mouvements involontaires et anormaux tels que des dyskinésies axiales (torsion axiale du cou et du tronc dans le sens opposé à la lésion), des dyskinésies oro-linguales (mouvements masticatoires répétitifs en l'absence de nourriture) et des dyskinésies de la patte (saccades répétitives de la patte opposée à la lésion). Chacun de ces comportements anormaux peut s'exprimer avec une intensité variable : de modérée (score 1 : mouvement exprimé pendant un temps inférieur à 30 s) à particulièrement forte (score 4 : mouvement exprimé pendant toute la minute d'observation, l'animal ne réagissant pas à un stimulus tactile). Une ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées met en évidence une variation significative des scores présentés, au cours du temps, par les animaux « dyskinétiques » ($F(47,287) = 99,419$; $p < 0,001$). Plus

précisément, la L-DOPA induit une augmentation significative des mouvements anormaux dès la seconde session de test (*cf.* Figure 27) ($16,3 \pm 2,1$ vs. $9,3 \pm 1,6$; + 75,3 % ; $p < 0,01$; $n = 48$). Cette augmentation perdure jusqu'à la troisième session, comparativement au second test (respectivement $31,7 \pm 2,2$ vs. $16,3 \pm 2,1$; + 94,5 % ; $p < 0,001$). Le nombre de mouvements dyskinétiques atteint une valeur maximale de $41,6 \pm 1,8$ lors du 5^{ème} test et se stabilise ensuite (Figure 47). Le nombre de mouvements involontaires chez les animaux « non dyskinétiques » est en moyenne égal à $0,6 \pm 0,1$ au cours des 6 sessions de test ($n = 33$).

Nos résultats confirment ceux observés chez le Rat dans des conditions expérimentales similaires. En effet, des mastications, des mouvements saccadés de la patte antérieure ainsi que des torsions du tronc et de la tête ont été décrits chez des rats lésés à la 6-OHDA ayant reçu des injections quotidiennes de L-DOPA (6 à 200 mg/kg) pendant 20 à 28 jours (Lee et coll., 2000 ; Lundblad et coll., 2002 ; Winkler et coll., 2002). Conformément à nos propres observations, il a été rapporté que l'utilisation des doses de L-DOPA les plus faibles (de 6 à 10 mg/kg) induit le développement de ces mouvements involontaires chez près de la moitié des animaux lésés à la 6-OHDA, permettant ainsi de distinguer deux populations d'animaux : (a) un groupe d'animaux non dyskinétiques, ne présentant pas de mouvements involontaires et anormaux et chez lesquels la L-DOPA possède un effet anti-akinétique et (b) un groupe d'animaux dyskinétiques, chez lesquels le traitement à L-DOPA provoque des mouvements involontaires et anormaux qui s'expriment de manière intense et stable pendant le pic de dose de L-DOPA (Picconi et coll., 2003 ; Valastro et coll., 2007). Le protocole d'étude des mouvements involontaires et anormaux utilisé dans ces études, identique à celui que nous avons employé, a été récemment développé par Cenci et coll. (1998) selon des principes similaires à ceux permettant d'évaluer l'intensité des dyskinésies en clinique humaine (Hagell & Widner, 1999). Cette méthode diffère ainsi radicalement de celles auparavant utilisées pour quantifier les dyskinésies et stéréotypies chez le Rat et dans lesquelles n'étaient

Mouvements involontaires anormaux (unités arbitraires)

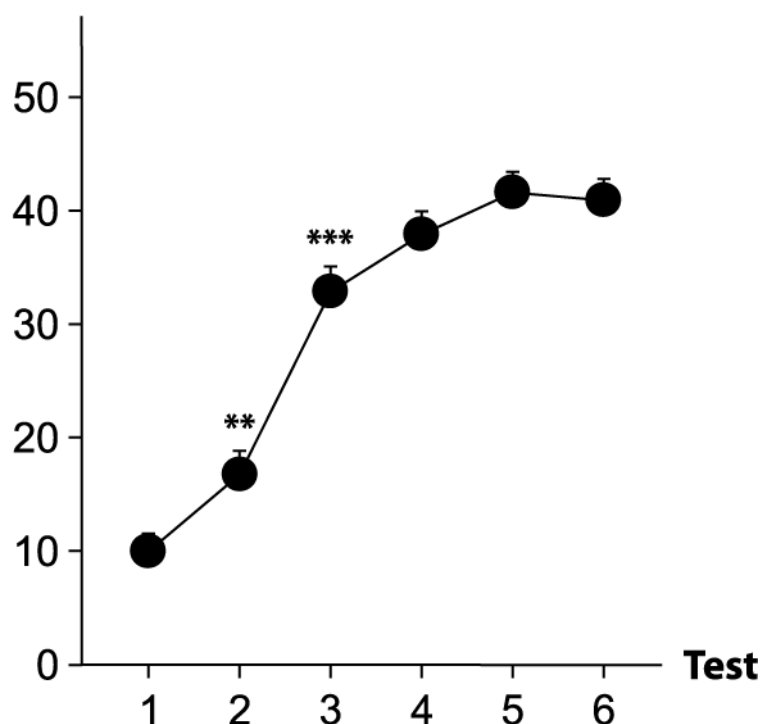


Figure 47 : Évolution en fonction du temps des mouvements involontaires anormaux induits par la L-DOPA chez des animaux hémi-parkinsoniens.

Deux semaines après la lésion unilatérale du MFB par injection de 6-OHDA, les animaux reçoivent, quotidiennement et pendant 3 semaines, une injection *i.p.* d'une solution composée de L-DOPA (6 mg/kg) et de benserazide (15 mg/kg). 20 min après le traitement, les animaux sont soumis à un test d'évaluation des mouvements involontaires anormaux, à raison de 2 tests consécutifs par semaine. Les données, exprimées en unités arbitraires, correspondent aux moyennes \pm S.E.M. des scores obtenus à chaque test d'évaluation des mouvements anormaux par les 48 animaux ayant présenté ces dysfonctionnements moteurs. Les résultats sont comparés à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées suivies par un test de Tukey. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. test précédent ($n = 48$).

comptabilisées que la présence ou l'absence de comportements tels que la mastication, le léchage et le toilettage (Creese & Iversen, 1973 ; Lindner et coll., 1996). Le protocole que nous avons utilisé se limite, en outre, à l'évaluation de mouvements anormaux clairement classifiés comme dyskinétiques, l'expression de comportements moteurs normaux étant ignorée (toilettage, rongement, redressement, reniflement). Cependant, bien qu'ils soient généralement mesurés dans les études de référence, nous avons fait le choix de ne pas étudier les mouvements involontaires de type rotatoire, en raison de leur caractère controversé. Ces mouvements anormaux furent initialement décrits par l'équipe d'Ungerstedt (Ungerstedt &

Arbuthnott, 1970 ; Ungerstedt, 1976) dont les travaux ont révélé que l'injection de L-DOPA provoque, comme le font les agonistes dopaminergiques directs, l'apparition de rotations dans le sens opposé à une lésion nigro-striatale unilatérale. Certains auteurs ont suggéré que ces rotations contralatérales pourraient en fait constituer la principale manifestation motrice résultant du traitement par la L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien (Nutt, 1990 ; Chase, 1998 ; Brotchie & Fox, 1999 ; Langston et coll., 2000). Néanmoins, aucune corrélation entre ces rotations contralatérales induites par la L-DOPA et les autres types de mouvements dyskinétiques n'a été démontrée. En effet, l'administration de bromocriptine, agent anti-parkinsonien n'induisant pas *de novo* de dyskinésies, provoque d'importantes rotations contralatérales en l'absence de mouvements involontaires et anormaux (Lundblad et coll., 2002). En outre, une déafférentation dopaminergique anatomiquement restreinte au striatum latéral permet, en réponse au traitement par la L-DOPA, l'expression de mouvements anormaux au niveau de la patte et du système oro-lingual, mais prévient l'apparition de rotations contralatérales (Winkler et coll., 2002). Enfin, l'administration chronique de L-DOPA à des animaux ayant subi une lésion nigro-striatale bilatérale, et ne pouvant donc pas exprimer de comportement rotatoire, permet néanmoins l'apparition de mouvements involontaires et anormaux (Schallert et coll., 1979). De plus, les rotations contralatérales induites par la L-DOPA ne semblent pas résulter d'un atténuation de l'akinésie du côté ipsilatéral à la lésion. En effet, lorsque les animaux effectuent ces rotations en réponse au traitement par la L-DOPA, l'initiation et l'orientation contralatérale du mouvement apparaissent supportées par les membres contralatéraux (dont l'activité est régie par le striatum lésé) alors que les membres ipsilatéraux (contrôlés par le striatum intact) ne semblent effectuer que des appuis de rétablissement postural (Schallert & Tillerson, 2000). Enfin, il n'existe toujours aucun consensus vis-à-vis de l'origine comportementale de ces rotations qui sont indifféremment interprétées comme l'expression latéralisée d'une hyper-attention

sensorielle ou comme la manifestation d'asymétries dans le contrôle dopaminergique de la posture ou de la locomotion (*pour revues* : Miller & Beninger, 1991 ; Schwarting & Huston, 1996).

Le fait que le traitement chronique par la L-DOPA provoque deux réponses comportementales distinctes chez des animaux hémi-parkinsoniens, qui peuvent dès lors être répartis en deux groupes différents (dyskinétique et non dyskinétique), est particulièrement intéressant, puisqu'il permet d'étudier, dans une même expérience, les caractéristiques neurochimiques qui sous-tendent la présence ou l'absence de ces effets secondaires néfastes.

4.3.2.2 CARACTÉRISTIQUES NEUROCHIMIQUES DES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONIEN

Les concentrations tissulaires de dopamine se révèlent massivement réduites dans chacun des différents groupes, 5 semaines après la lésion nigro-striatale induite par la 6-OHDA. Ainsi, les animaux ayant reçu pendant 3 semaines une injection quotidienne de soluté physiologique de NaCl, en lieu et place d'une administration de L-DOPA, présentent, comparativement au striatum contralatéral, une diminution importante des contenus tissulaires en dopamine dans le striatum ipsilatéral à la lésion (respectivement $0,29 \pm 0,08$ nmol/mg de protéines vs. $1,47 \pm 0,18$ nmol/mg de protéines ; - 80,1 % ; $F(1,31) = 33,935$; $p < 0,001$; $n = 16$). Une analyse ANOVA à 2 facteurs, avec la [lésion par la 6-OHDA] et le [côté] (ipsilatéral et contralatéral) comme facteurs, montre l'existence d'une interaction entre ces deux facteurs ([lésion par la 6-OHDA] x [côté] ; $F(1,59) = 14,601$; $p < 0,001$; $n = 14$ et 16). Plus précisément, cette analyse révèle que les concentrations de dopamine mesurées dans le striatum ipsilatéral des animaux lésés par la 6-OHDA, mais non traités par la L-DOPA, sont significativement réduites comparativement à celles mesurées dans le striatum ipsilatéral d'animaux naïfs, ayant reçu

une injection de soluté physiologique dans le MFB à la place de l'injection de 6-OHDA ($0,29 \pm 0,08$ nmol/mg de protéines *vs.* $1,48 \pm 0,15$ nmol/mg de protéines ; $p < 0,001$; $n = 16$ et 14). En revanche, aucune modification n'est observée dans le striatum contralatéral de ces animaux (respectivement $1,47 \pm 0,18$ nmol/mg de protéines *vs.* $1,57 \pm 0,20$ nmol/mg de protéines ; $p > 0,05$; $n = 14$ et 16). De plus, une analyse ANOVA à 1 facteur ne met en évidence aucune différence au niveau des concentrations de dopamine évaluées, pour chacun des différents groupes, dans le striatum contralatéral ($F(5,110) = 1,859$; $> 0,05$; $n = 12$ à 36). Dans les analyses ultérieures, les résultats ont, par conséquent, été exprimés en % des rapports [concentration de dopamine dans le striatum ipsilatéral] / [concentration de dopamine dans le striatum contralatéral]. Le groupe d'animaux lésés par la 6-OHDA mais non traités par la L-DOPA a, par ailleurs, été choisi comme témoin (T6-OHDA). Une analyse ANOVA à un facteur révèle une différence significative entre les 3 différents groupes d'animaux : animaux témoins lésés par la 6-OHDA ; animaux traités par la L-DOPA non dyskinétiques ; animaux traités par la L-DOPA dyskinétiques ($F(2,72) = 8,928$; $p < 0,001$). Plus précisément, cette analyse indique que la concentration de dopamine dans le striatum ipsilatéral des animaux dyskinétiques est significativement plus faible que celle présentée par les animaux n'exprimant pas de dyskinésies en réponse au traitement par la L-DOPA (respectivement $7,7 \pm 1,1$ % *vs.* $29,1 \pm 6,8$ % ; $- 73,6$ % ; $p < 0,001$; $n = 36$ et 21 ; Figure 48). En revanche, par rapport au groupe contrôle, aucune différence significative n'est observée chez les animaux dyskinétiques (respectivement $20,0 \pm 4,0$ % *vs.* $7,7 \pm 1,1$ % ; $p > 0,05$; $n = 16$ et 36) ou non dyskinétiques (respectivement $20,0 \pm 4,0$ % *vs.* $29,1 \pm 6,8$ % ; $p > 0,05$; $n = 16$ et 21). Enfin, la diminution des concentrations striatales de dopamine observée chez les animaux dyskinétiques comparativement aux animaux non dyskinétiques coïncide avec une réduction des scores respectivement obtenus par ces animaux aux épreuves des rotations induites par

Concentration striatale de dopamine (% des rapports [côté droit]/[côté gauche])

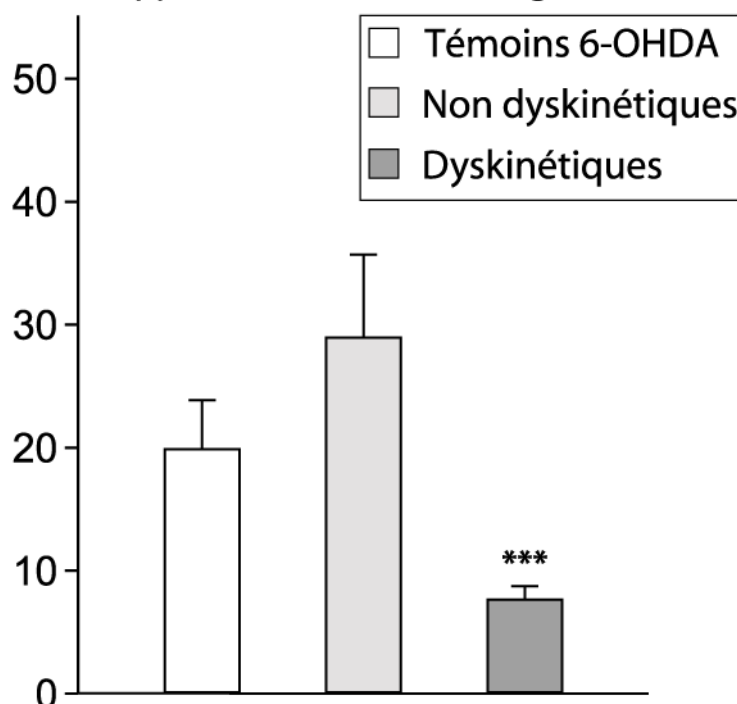


Figure 48 : Évaluation des concentrations tissulaires de dopamine dans le striatum d'animaux avant subi, 5 semaines plus tôt, une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale et soumis ou non au traitement par la L-DOPA.

Deux semaines après la lésion unilatérale du MFB par injection de 6-OHDA, les animaux reçoivent, quotidiennement et pendant 3 semaines, une injection *i.p.* d'une solution composée de L-DOPA (6 mg/kg) et de benserazide (15 mg/kg). Les animaux témoins reçoivent, en revanche, une injection de soluté physiologique. À l'issue des 3 semaines de traitement, les concentrations tissulaires de dopamine sont évaluées à partir des striata ipsi- et contralatéraux. Les concentrations de dopamine chez les animaux témoins lésés à la 6-OHDA sont égales à $0,29 \pm 0,08$ nmol/mg de protéines dans le striatum ipsilatéral et à $1,47 \pm 0,18$ nmol/mg de protéines dans le striatum contralatéral. Pour chaque animal, les données sont exprimées en % des rapports [concentration de dopamine dans le striatum ipsilatéral]/[concentration de dopamine dans le striatum contralatéral]. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur suivie par un test de Tukey. *** $P < 0,001$ vs. groupe d'animaux témoins non dyskinétiques ($n = 16$ à 36).

l'amphétamine ($14,3 \pm 1,8$ tr/min vs. $8,3 \pm 2,0$ tr/min ; + 72,3 % ; $F(1,56) = 4,544$; $p < 0,05$; $n = 36$ et 21), confirmant l'existence d'une corrélation négative entre ces deux paramètres.

Contrairement aux résultats obtenus pour la dopamine, les concentrations tissulaires de glutamate ne sont affectées dans aucun des différents groupes. En effet, aucune modification des concentrations tissulaires de glutamate n'est observée, comparativement au striatum contralatéral, dans le striatum ipsilatéral d'animaux lésés par la 6-OHDA ayant reçu, à la

place de la L-DOPA, une injection quotidienne de soluté physiologique (respectivement $52,4 \pm 6,5$ nmol/mg de protéines vs. $50,9 \pm 6,9$ nmol/mg de protéines ; $F(1,31) = 0,0236$; $p > 0,05$; $n = 16$). Une analyse ANOVA à 2 facteurs ne met, en outre, en évidence aucune interaction entre les facteurs [lésion] et [côté] en ce qui concerne les concentrations tissulaires de glutamate évaluées dans le striatum d'animaux non lésés comparativement à des animaux lésés par la 6-OHDA mais non traités par la L-DOPA (striatum ipsilatéral : $53,2 \pm 5,7$ nmol/mg de protéines vs. $50,9 \pm 6,9$ nmol/mg de protéines ; striatum contralatéral : $57,5 \pm 6,5$ nmol/mg de protéines vs. $52,4 \pm 6,5$ nmol/mg de protéines ; $F(1,59) = 0,0504$; $p > 0,05$; $n = 14$ et 16). De plus, une analyse ANOVA à 1 facteur ne révèle aucune différence entre les concentrations de glutamate présentées, dans le striatum contralatéral, chez chacun des différents groupes ($F(5,110) = 0,188$; $> 0,05$; $n = 12$ à 36). Dans les analyses ultérieures, les résultats ont donc été également exprimés en % des rapports [concentration de glutamate dans le striatum ipsilatéral] / [concentration de glutamate dans le striatum contralatéral] et le groupe d'animaux lésés par la 6-OHDA mais non traités par la L-DOPA a, de nouveau, été choisi comme témoin (T6-OHDA). L'analyse ANOVA à un facteur, réalisée à partir de ces données, ne montre aucune différence significative entre les 3 différents groupes ($F(2,72) = 0,0735$; $p > 0,05$). Plus précisément, cette analyse indique que la concentration de glutamate dans le striatum ipsilatéral des animaux dyskinétiques ne diffère pas de celle présentée par les animaux n'exprimant pas de dyskinésies en réponse au traitement par la L-DOPA (respectivement $97,4 \pm 2,3$ % vs. $98,4 \pm 4,2$ % ; $p > 0,05$; $n = 36$ et 21 ; Figure 49). De même, par rapport au groupe témoin, aucune différence significative n'est observée chez les animaux dyskinétiques (respectivement $96,4 \pm 3,3$ % vs. $97,4 \pm 2,3$ % ; $p > 0,05$; $n = 16$ et 36) ou non dyskinétiques (respectivement $96,4 \pm 3,3$ % vs. $98,4 \pm 4,2$ % ; $p > 0,05$; $n = 16$ et 21).

Nos résultats indiquent une réduction massive des concentrations tissulaires de dopamine dans le striatum ipsilatéral d'animaux lésés unilatéralement par la 6-OHDA et soumis ou non,

Concentration striatale de glutamate (% des rapports [côté droit]/[côté gauche])

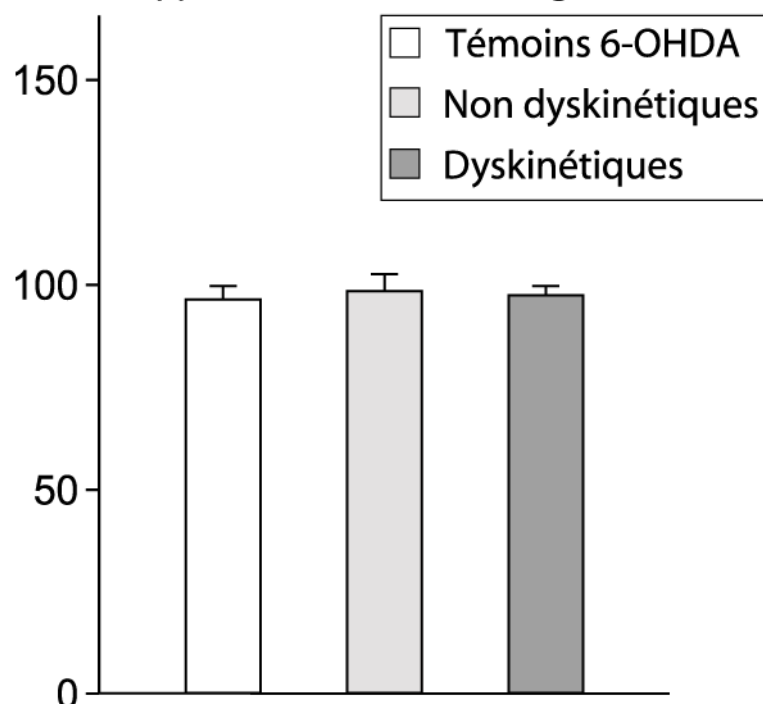


Figure 49 : Évaluation des concentrations tissulaires de glutamate dans le striatum d'animaux avant subi, 5 semaines plus tôt, une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale et soumis ou non au traitement par la L-DOPA.

Deux semaines après la lésion unilatérale du MFB par injection de 6OHDA, les animaux reçoivent, quotidiennement et pendant 3 semaines, une injection *i.p.* d'une solution composée de L-DOPA (6 mg/kg) et de benserazide (15 mg/kg). Les animaux témoins reçoivent, en revanche, une injection de soluté physiologique. À l'issue des 3 semaines de traitement, les concentrations tissulaires de glutamate sont évaluées à partir des striata ipsi- et contralatéraux. Les concentrations de glutamate chez les animaux témoins lésés à la 6-OHDA sont égales à $50,9 \pm 6,9$ nmol/mg de protéines dans le striatum ipsilatéral et à $52,4 \pm 6,5$ nmol/mg de protéines dans le striatum contralatéral. Pour chaque animal, les données sont exprimées en % des rapports [concentration de glutamate dans le striatum ipsilatéral]/[concentration de glutamate dans le striatum contralatéral]. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur suivie par un test de Tukey (n = 16 à 36).

pendant 3 semaines, au traitement par L-DOPA. Les concentrations de dopamine, exprimées en % des rapports [concentration dans le striatum ipsilatéral] / [concentration dans le striatum contralatéral], sont réduites de manière plus importante dans le groupe d'animaux exprimant des mouvements dyskinétiques (- 92 %) sous l'effet du traitement par L-DOPA comparativement aux animaux ne présentant pas de dyskinésies (- 71 %). De plus, ces différences s'expriment également au niveau des épreuves des rotations induites par l'amphétamine dans lesquelles il apparaît, *a posteriori*, que les animaux dyskinétiques

présentent un comportement rotatoire plus intense que les animaux non dyskinétiques (+ 72 %). Ces résultats confirment les précédentes études indiquant que les mouvements involontaires et anormaux résultant de l'administration chronique de L-DOPA, à des doses quotidiennes comprises entre 6 et 20 mg/kg qui, chez le Rat, reproduisent l'apparition progressive des dyskinésies observée chez les patients parkinsoniens (Cenci et coll., 1998 ; Picconi et coll., 2003), surviennent chez les animaux présentant une destruction des corps cellulaires des neurones dopaminergiques de la substance noire ou des terminaisons dopaminergiques striatales supérieure à 80 % (*pour revue* : Winkler et coll., 2002). Administrée à de plus larges doses, la L-DOPA provoque une diminution de la latence d'apparition des dyskinésies ainsi qu'une augmentation de leur intensité (Lindgren et coll., 2007). Par ailleurs, comme nous l'avons nous-même observé, la L-DOPA est capable d'induire des mouvements involontaires et anormaux dès la première administration lorsqu'elle est injectée à des animaux présentant une dénervation dopaminergique très intense (Jenner, 2000 ; Lindgren et coll., 2007). En outre, ces résultats expérimentaux sont eux-mêmes en accord avec les données cliniques indiquant que, chez les patients parkinsoniens, le risque de développer des mouvements dyskinétiques est positivement corrélé à la sévérité de la pathologie ainsi qu'à la dose de L-DOPA initialement ou cumulativement administrée (*pour revue* : Schrag & Quinn, 2000). Les fluctuations motrices et dyskinésies induites par la L-DOPA apparaissent en effet étroitement liées à ses propriétés pharmacocinétiques caractérisées par une demi-vie plasmatique relativement courte, que l'on estime chez l'Homme de l'ordre de 60 à 90 min (Rezack, 2007). Ainsi, dans les premiers stades de la maladie, les neurones dopaminergiques survivants sont capables d'assurer l'amortissement de cette cinétique, grâce à leur capacité de stockage et de libération de dopamine. L'effet de la L-DOPA reste alors stable sur une période de temps relativement longue. En revanche, lorsque la déafférentation dopaminergique devient majeure, le traitement par la L-DOPA ne permet

plus d'assurer une stimulation dopaminergique stable, laquelle fluctue dès lors au gré de la concentration plasmatique en L-DOPA. Cette restauration non physiologique de l'activité dopaminergique, caractérisée par des cycles d'augmentation et de déclin, est classiquement considérée comme capitale dans la physiopathologie des mouvements dyskinétiques (Chase, 1998).

De manière similaire aux résultats obtenus 15 jours après la déafférentation dopaminergique, les taux tissulaires de glutamate se sont révélés inchangés dans le striatum d'animaux ayant reçu pendant les 3 semaines suivantes une injection quotidienne de L-DOPA. Les données de la littérature indiquent, en revanche, que les dyskinésies induites par la L-DOPA sont généralement associées à une augmentation de l'activité glutamatergique. Ainsi, il a par exemple été mis en évidence chez le « singe MPTP » que l'administration systémique d'un antagoniste compétitif des récepteurs de type NMDA abolit les dyskinésies oro-linguales et réduit les mouvements choréïques (environ - 70 %), sans altérer les propriétés anti-parkinsoniennes de la L-DOPA (Papa & Chase, 1996). De même, l'administration d'un antagoniste des récepteurs NMDA à des patients parkinsoniens améliore leurs scores dyskinétiques moyens et maximaux, d'un facteur supérieur à 50 %, sans compromettre l'efficacité de la réponse anti-parkinsonienne induite par la L-DOPA (Verhagen Metman et coll., 1998). Nos résultats pourraient paraître incohérents avec ces données mais, comme nous l'avons précédemment mentionné, les concentrations tissulaires de glutamate ne représentent pas un index fiable de l'activité des neurones glutamatergiques.

Hormis en ce qui concerne ce dernier point, les données neurochimiques et comportementales que nous avons obtenues dans les expériences précédentes confirment l'adéquation du modèle du rat héli-parkinsonien traité à la L-DOPA avec la physiopathologie clinique des dyskinésies induites par la L-DOPA. D'une part, les dyskinésies apparaissent chez les animaux présentant les déficits dopaminergiques les plus importants. Elles s'installent en

outre de manière progressive, en réponse à de faibles doses de L-DOPA. De plus, les animaux expriment des mouvements anormaux de type choréique qui sont caractéristiques des dyskinésies de pic de dose observées chez le patient parkinsonien. Conjointement, ces données démontrent donc la validité de ce modèle dans nos conditions expérimentales.

4.3.3 RÔLE DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ DANS LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONIEN

Les peptides opioïdes sont présents en concentration élevée dans les noyaux gris centraux et plus particulièrement au niveau striatal (Haber & Watson, 1985 ; Graybiel, 1986). Les deux principales théories rendant actuellement compte de la physiopathologie des dyskinésies induites par la L-DOPA dans le cadre de la maladie de Parkinson impliquent les systèmes de transmissions dopaminergique et glutamatergique du striatum et nos expériences neurochimiques indiquent, par ailleurs, que les récepteurs opioïdes de type δ , auxquels les enképhalines se lient préférentiellement, sont précisément capables de moduler ces deux systèmes. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une éventuelle influence des récepteurs opioïdes δ sur les dyskinésies induites chez le rat hémi-parkinsonien par la L-DOPA. Nous avons tout d'abord étudié les effets d'une administration aigue de DPDPE ou de naltrindole sur l'expression des dyskinésies. Dans un second temps, nous avons mesuré la densité des sites de liaison de la [3 H]-DPDPE chez les animaux présentant ou non des dyskinésies en réponse au traitement par la L-DOPA.

4.3.3.1 EFFETS D'UNE ADMINISTRATION I.C.V. DE DPDPE OU DE NALTRINDOLE SUR LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONNIEN

Le dernier jour des 3 semaines de traitement chronique par la L-DOPA, les animaux reçoivent une injection *i.c.v.* d'une solution contenant soit 10 µg de DPDPE, soit 10 µg de naltrindole, dans un volume de 5 µL. Cette injection, effectuée au débit de 12 µL/min, survient 10 min après l'administration *i.p.* de L-DOPA et 10 min avant le test final d'évaluation des mouvements dyskinétiques. Comme l'indique la Figure 47, l'intensité des mouvements dyskinétiques est stable au cours des 2 sessions (tests 5 et 6) qui précèdent le test final durant lequel les animaux sont soumis aux injections *i.c.v.* de DPDPE ou de naltrindole. Les résultats concernant les effets de la DPDPE et du naltrindole sur les dyskinésies sont donc exprimés en % du résultat obtenu par chaque animal lors de la session précédente (test 6). Une ANOVA à 1 facteur révèle ainsi une différence significative entre le groupe d'animaux dyskinétiques soumis au traitement par la DPDPE et celui ayant reçu une injection *i.c.v.* de soluté physiologique ($F(1,23) = 7,680$; $p = 0,011$). Plus précisément, cette analyse indique que, comparativement aux animaux dyskinétiques témoins, l'injection *i.c.v.* d'une solution de DPDPE augmente significativement les mouvements involontaires et anormaux induits par la L-DOPA (respectivement $103,3 \pm 6,5$ % vs. $136,5 \pm 10,1$ % ; + 32,1 % ; $p < 0,05$; $n = 12$; Figure 50A). Une ANOVA à 1 facteur et à mesures répétées révèle, en revanche, que l'administration *i.c.v.* de DPDPE à des animaux non dyskinétiques est sans effet ($F(1,41) = 0,407$; $p > 0,05$; $n = 21$), ces derniers n'exprimant pas de mouvements dyskinétiques (respectivement $0,3 \pm 0,2$ vs. $0,5 \pm 0,2$). Une ANOVA à un facteur met en évidence une différence significative entre le groupe d'animaux dyskinétiques ayant reçu une injection *i.c.v.* de naltrindole, comparativement à celui traité avec du soluté physiologique ($F(1,23) = 4,666$; $p = 0,042$). Cette analyse indique par ailleurs que, comparativement au groupe témoin, l'injection *i.c.v.* d'une solution de naltrindole diminue significativement l'intensité des

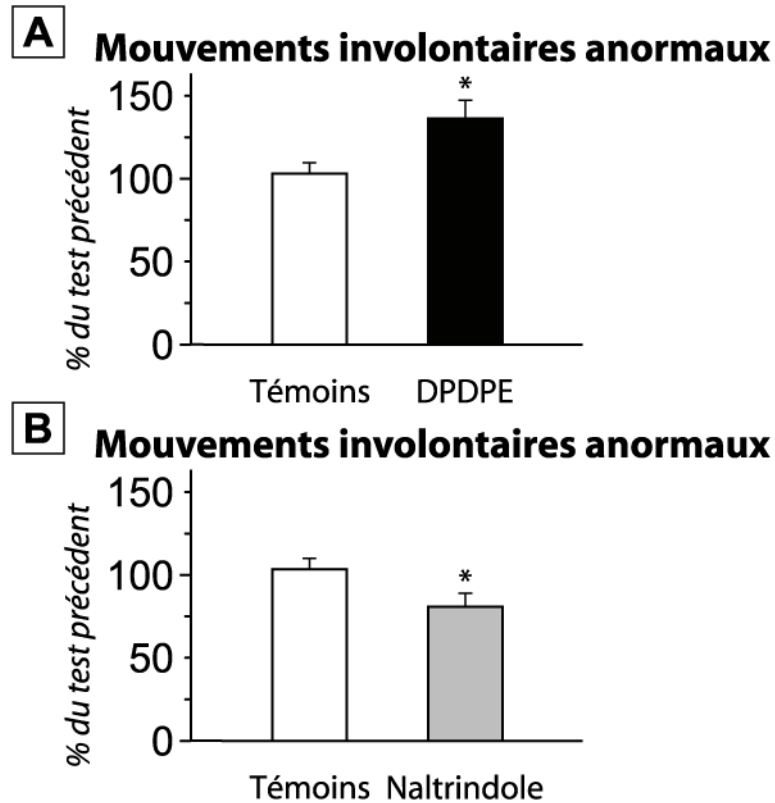


Figure 50 : Effets de la DPDPE et du naltrindole sur les mouvements involontaires anormaux induits par la L-DOPA chez des animaux hémiparkinsoniens.

Deux semaines après la lésion unilatérale du MFB par injection de 6-OHDA, les animaux reçoivent, quotidiennement et pendant 3 semaines, une injection *i.p.* d'une solution composée de L-DOPA (6 mg/kg) et de benserazide (15 mg/kg). 20 min après le traitement, les animaux sont soumis à un test d'évaluation des mouvements involontaires anormaux, à raison de 2 tests consécutifs par semaine. À l'issue des 3 semaines de traitement, les animaux reçoivent également, avant ce test, une injection *i.c.v.* de DPDPE (10 μ g) (A) ou de naltrindole (10 μ g) (B). Les données sont, pour chaque animal, exprimées en % par rapport au résultat obtenu au test précédent. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur suivie par un test de Tukey. * $P < 0,05$ vs. groupe d'animaux dyskinétiques témoins ($n = 12$).

mouvements involontaires et anormaux induits par la L-DOPA (respectivement $103,3 \pm 6,5$ % vs. $80,9 \pm 8,1$ % ; - 21,7 % ; $p < 0,05$; $n = 12$; Figure 50B).

Ces résultats montrent que les récepteurs opioïdes de type δ sont capables de moduler l'intensité des mouvements dyskinétiques exprimés par des animaux lésés unilatéralement par la 6-OHDA et traités de manière chronique par la L-DOPA. L'effet propre du naltrindole indique, en outre, que les enképhalines endogènes modulent probablement l'expression de ces mouvements dyskinétiques de manière tonique.

4.3.3.2 ÉVALUATION DE LA LIAISON STRIATALE DE [³H]-DPDPE CHEZ DES ANIMAUX HÉMI-PARKINSONIENS EXPRIMANT OU NON DES DYSKINÉSIES EN RÉPONSE AU TRAITEMENT PAR LA L-DOPA

L'influence des récepteurs δ sur l'expression des comportements dyskinétiques induits par la L-DOPA, révélée dans nos expériences précédentes, grâce à la DPDPE et au naltrindole, nous a incité à mesurer, chez ces mêmes animaux, le taux de radioliation striatal de la [³H]-DPDPE. Celle-ci est évaluée à la concentration de 4 nM sur une préparation de membranes isolées à partir du striatum entier, le lendemain du test au cours duquel sont effectuées les injections *i.c.v.* de naltrindole ou de DPDPE. Chez les animaux lésés par la 6-OHDA mais ayant reçu une injection quotidienne de soluté physiologique à la place de la L-DOPA, aucune différence n'est observée entre les deux hémisphères au niveau de la liaison spécifique de [³H]-DPDPE ($48,2 \pm 4,1$ fmol/mg de protéines dans le striatum ipsilatéral vs. $51,2 \pm 4,2$ fmol/mg de protéines dans le striatum contralatéral ; $F(1,31) = 0,267$; $p > 0,05$; $n = 16$). De même, une analyse ANOVA à 2 facteurs ne révèle aucune interaction entre les facteurs [lésion] et [côté] (ipsilatéral et contralatéral) en ce qui concerne le nombre de récepteurs δ exprimés au niveau striatal par des animaux naïfs (ayant reçu une injection de soluté physiologique dans le MFB à la place d'une injection de 6-OHDA) comparativement à des animaux lésés par la 6-OHDA et non traités par la L-DOPA ($F(1,59) = 0,135$; $p > 0,05$; $n = 14$ et 16). En outre, une analyse ANOVA à 1 facteur ne révèle aucune différence des taux de liaison de [³H]-DPDPE mesurés dans le striatum contralatéral de chacun des différents groupes ($F(5,110) = 0,107$; $> 0,05$; $n = 14$ à 36). Les résultats ont, par conséquent, été exprimés en % des rapports [radioliation spécifique dans le striatum ipsilatéral] / [radioliation spécifique dans le striatum contralatéral] et le groupe d'animaux lésés par la 6-OHDA mais non traités par la L-DOPA a ainsi été considéré comme témoin. L'analyse ANOVA à 1 facteur révèle une différence significative entre les 3 différents groupes d'animaux : animaux témoins lésés par la 6-OHDA ; animaux traités par la L-DOPA non dyskinétiques ; animaux

traités par la L-DOPA dyskinétiques ($F(2,72) = 3,811$; $p = 0,027$). Plus précisément, cette analyse indique que, comparativement au groupe d'animaux soumis à une injection quotidienne de soluté physiologique, le taux de radiolisation de [^3H]-DPDPE est significativement réduit chez les animaux n'exprimant pas de dyskinésies en réponse au traitement par la L-DOPA (respectivement $95,2 \pm 4,7$ % vs. $82,8 \pm 3,1$ % ; - 13,0 % ; $p < 0,05$; $n = 16$ et 21 ; Figure 51). En revanche, aucune différence n'est observée chez les animaux dyskinétiques par rapport au groupe contrôle (respectivement $92,4 \pm 2,7$ % vs. $95,2 \pm 4,7$ % ; $p > 0,05$; $n = 36$ et 16).

Nos résultats indiquent l'implication des récepteurs opioïdes δ dans les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien. Cette influence est démontrée tant sur le plan de l'expression quantitative des récepteurs δ striataux que de manière fonctionnelle par administration *in vivo* d'un agoniste et d'un antagoniste de ces récepteurs. D'autres études ont récemment suggéré l'implication des systèmes opioïdes dans la pathogenèse des dyskinésies induites par la L-DOPA, bien que certaines données contradictoires n'aient pas permis de faire émerger un consensus sur leur rôle. Les premières données ont concerné les peptides opioïdes, utilisés comme co-transmetteurs par les neurones GABAergiques des voies directe et indirecte (Steiner & Gerfen, 1998), dont il apparaît que les précurseurs, les préproenképhalines A et B (PPE-A et PPE-B), sont synthétisés en plus grande quantité dans les neurones striataux efférents, aussi bien dans les modèles parkinsoniens expérimentaux (Engber et coll., 1991 ; Taylor et coll., 1992 ; Cenci et coll., 1998 ; Duty et coll., 1998 ; Westin et coll., 2001 ; Henry et coll., 2003 ; Winkler et coll., 2002) que *post mortem* chez des patients parkinsoniens (de Ceballos et coll., 1993 ; Calon et coll., 2002a ; Henry et coll., 2003). Ces données sont confirmées par l'augmentation de la transmission opioïde observée, grâce à la technique de tomographie par émission de positons (TEP), chez des patients parkinsoniens atteints de dyskinésies (Piccini et coll., 1997). Bien qu'une corrélation entre les

Radioliation de [³H]-DPDPE (% des rapports [côté droit]/[côté gauche])

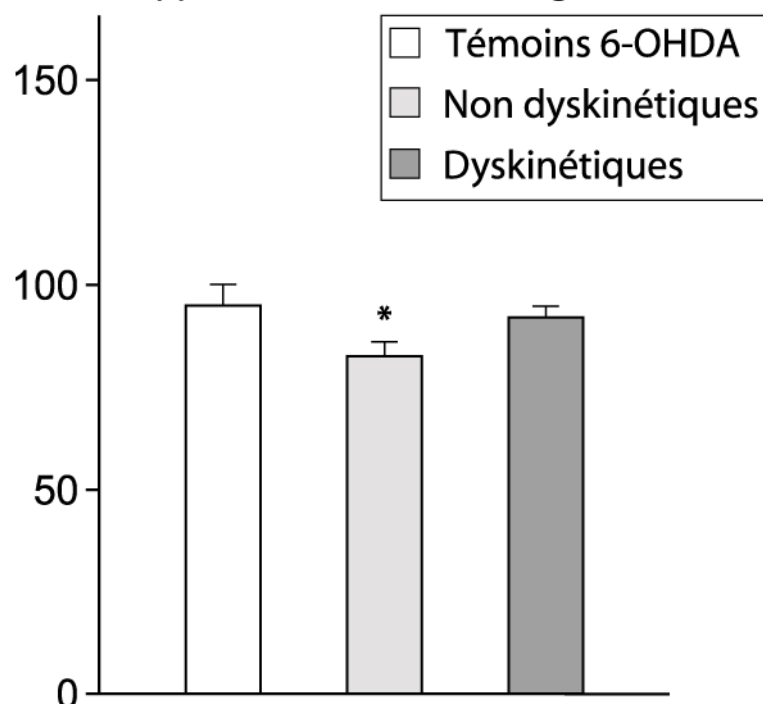


Figure 51 : Évaluation de la liaison de [³H]-DPDPE à des membranes striatales d'animaux avant 5 semaines plus tôt une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale et soumis ou non au traitement chronique par la L-DOPA.

Deux semaines après la lésion unilatérale du MFB par injection de 6OHDA, les animaux reçoivent, quotidiennement et pendant 3 semaines, une injection *i.p.* d'une solution composée de L-DOPA (6 mg/kg) et de benserazide (15 mg/kg). Les animaux témoins reçoivent une injection de soluté physiologique. À l'issue des 3 semaines de traitement, la radioliation de [³H]-DPDPE (4 nM) est évaluée sur des suspensions de membranes préparées à partir du striatum ipsilatéral. La liaison spécifique de [³H]-DPDPE dans le striatum ipsilatéral des animaux témoins est de $52,8 \pm 2,7$ fmol/mg de protéines. Les données sont, pour chaque animal, exprimées en % des rapports [liaison spécifique dans le striatum ipsilatéral]/[liaison spécifique dans le striatum contralatéral]. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur suivie par un test de Tukey. * $P < 0,05$ vs. groupe témoin dyskinétique ayant reçu une injection *i.c.v.* de soluté physiologique (n = 16 à 36).

dyskinésies et une activation des systèmes opioïdes soit communément acceptée, on ne sait si cette influence s'exerce au niveau des mécanismes responsables du développement des comportements dyskinétiques ou de ceux impliqués dans l'expression de mouvements dyskinétiques préexistants. En ce qui concerne plus particulièrement les récepteurs opioïdes de type δ , plusieurs études autoradiographiques indiquent, chez le Rat, une diminution du taux de radioliation de la [³H]-DPDPE dans le striatum ipsilatéral 1 mois (Trovero et coll., 1990 ; Smith et coll., 1993) et 2 mois (Johansson et coll., 2001) après une déafférentation

dopaminergique unilatérale. De même, une réduction du nombre de récepteurs δ a également été observée *post mortem* chez le patient parkinsonien (Fernandez et coll., 1994). Initialement, ces résultats ont été interprétés comme la preuve attestant d'une localisation présynaptique des récepteurs δ au niveau des terminaisons dopaminergiques. Or, cette hypothèse a été réfutée par des études cytoarchitecturales plus précises, indiquant que les terminaisons nigro-striatales sont dépourvues de récepteurs δ (Le Moine et coll., 1994 ; Mansour et coll., 1994 ; Guttenberg et coll., 1996). De plus, Smith et coll. (1993) ont indiqué que l'expression de l'ARNm des récepteurs δ n'est pas altérée dans le cas de lésions partielles (< 90 %), bien que ces dernières provoquent néanmoins une importante déafférentation dopaminergique. Les diminutions d'expression striatale des récepteurs δ observées dans ces études après lésion des neurones dopaminergiques sont généralement interprétées comme le reflet de mécanismes postsynaptiques compensatoires résultant, par exemple, de l'augmentation d'expression des peptides opioïdes. Dans nos propres expériences, nous n'avons observé aucune altération du taux de radiolisation de [³H]-DPDPE dans le striatum ipsilatéral d'animaux préalablement soumis à une destruction unilatérale des neurones nigro-striataux. Des considérations d'ordre méthodologique telles que l'utilisation d'une approche analytique différente (radiolisation sur homogénats membranaires *vs.* autoradiographie), de délais postlésionnels variables ou encore de divers sites d'injection (MFB ou SNc) pourraient rendre compte de l'incohérence de nos résultats vis-à-vis de ceux précédemment cités. Le fait que Dilts & Kalivas (1990) n'aient observé, dans le striatum ipsilatéral, aucune modification du taux de radiolisation aux récepteurs δ après lésion des neurones nigro-striataux par la 6-OHDA semble confirmer nos résultats. De manière intéressante, Johansson et coll. (2001) ont rapporté que le traitement par la L-DOPA augmente significativement le nombre de sites de liaison de la [³H]-DPDPE dans le striatum contralatéral des animaux dyskinétiques, révélant ainsi une différence vis-à-vis du groupe d'animaux non dyskinétiques. De même, nous avons observé, dans le striatum

ipsilatéral, une réduction significative de ce taux de liaison chez les animaux non dyskinétiques comparativement au groupe d'animaux lésés par la 6-OHDA mais non traités par la L-DOPA. Par ailleurs, il a été mis en évidence dans les expériences de radioliation spécifique aux récepteurs opioïdes que les lésions affectant l'innervation dopaminergique ne modifient que la valeur de B_{max} et non celle du K_D (Eghbali et coll., 1987 ; Fernandez et coll., 1994). Il est par conséquent probable que l'altération du taux de radioliation de la [3H]-DPDPE observée chez les animaux non dyskinétiques reflète une diminution du nombre de récepteurs δ au niveau du striatum ipsilatéral à la déafférentation dopaminergique. L'expression des récepteurs δ dans le striatum ipsilatéral est en outre identique chez les animaux témoins non soumis à la lésion par la 6-OHDA et chez ceux lésés par la 6-OHDA mais non traités par la L-DOPA. La modification du nombre de récepteurs δ observée dans notre étude chez les animaux non dyskinétiques semble donc précisément résulter du traitement par L-DOPA. Cette hypothèse suggère que des mécanismes compensatoires pourraient avoir été spécifiquement induits chez ces animaux. L'interprétation selon laquelle la diminution du nombre de récepteurs opioïdes δ résultant de ces adaptations pourrait précisément prévenir l'apparition des dyskinésies en s'opposant à la potentialisation exercée de manière tonique par les enképhalines endogènes est particulièrement attrayante. Compte tenu de la faible amplitude de cette différence d'expression, il est, par ailleurs, également possible qu'elle représente une variabilité interindividuelle préexistante que le traitement par la L-DOPA aurait simplement révélée ou accentuée. Ces deux hypothèses suggèrent implicitement un rôle déterminant des récepteurs opioïdes δ dans le développement des dyskinésies. Le fait que l'administration *i.c.v.* de DPDPE n'ait pas permis d'induire de mouvements dyskinétiques chez ces animaux semble de prime abord abonder en ce sens. Cependant, l'absence d'effet inducteur de la DPDPE chez les animaux non dyskinétiques pourrait aussi être interprétée comme le reflet d'altérations affectant précisément le nombre

et/ou la fonctionnalité des récepteurs δ striataux du côté ipsilatéral à la lésion. Néanmoins, nos expériences ne permettent pas d'exclure la possibilité que cette réduction plus importante du nombre de récepteurs opioïdes δ dans le striatum ipsilatéral des animaux non dyskinétiques ne soit en fait que la conséquence d'un autre mécanisme déterminant. Henry et coll. (2001) ont récemment montré chez le primate que l'administration de naltrindole réduit les mouvements involontaires résultant du traitement chronique par la L-DOPA. Des effets stimulants induits par les agonistes δ , tels qu'une augmentation, prévenue par le naltrindole, des comportements stéréotypés et locomoteurs (Spina et coll., 1998) ou un accroissement des effets stimulants moteurs de la cocaïne (Waddell & Holtzman, 1998), ont déjà été rapportés dans d'autres circonstances. Néanmoins, nos résultats démontrant que la DPDPE et le naltrindole provoquent respectivement une augmentation et une inhibition des dyskinésies induites par la L-DOPA sont, à notre connaissance, les premiers à confirmer, chez le Rat, une influence directe des récepteurs δ sur l'expression des comportements dyskinétiques résultant du traitement par la L-DOPA. Nos résultats suggèrent, par ailleurs, que les enképhalines endogènes potentialisent ces comportements dyskinétiques de manière tonique.

4.4 RÔLE DES NEURONES CORTICO-STRIATAUX DANS LA MODULATION EXERCÉE PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ SUR LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONNIEN

Les résultats précédents indiquent que, chez le rat hémi-parkinsonien, les récepteurs opioïdes δ exercent une influence sur les dyskinésies induites par la L-DOPA. Comme nous l'avons déjà mentionné, des altérations au niveau des systèmes de transmissions glutamatergique et dopaminergique striataux représentent les hypothèses les plus couramment évoquées pour rendre compte de la physiopathologie des dyskinésies induites par la L-DOPA. Nos

expériences neurochimiques indiquent, en outre, que les récepteurs opioïdes de type δ sont précisément capables de moduler ces deux systèmes, notamment ceux localisés au niveau des terminaisons glutamatergiques cortico-striatales. Par ailleurs, les récepteurs opioïdes δ sont également capables d'exercer des effets moteurs en amont, au niveau même des neurones dopaminergiques de la SNr, augmentant ainsi l'activité des neurones dopaminergiques nigro-striataux et provoquant l'apparition de rotations contralatérales (Matsumoto et coll., 1988). Dans cette dernière partie, nous avons donc recherché une éventuelle implication des neurones glutamatergiques cortico-striataux dans la modulation exercée par les récepteurs opioïdes δ sur les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien. Nous avons également mesuré l'expression striatale des récepteurs opioïdes δ chez les animaux présentant ou non des dyskinésies en réponse au traitement par la L-DOPA et ayant ou non subi une lésion des neurones cortico-striataux.

4.4.1.1 EFFETS DE LA LÉSION DU CORTEX IPSILATÉRAL SUR LES PARAMÈTRES NEUROCHIMIQUES ÉVALUÉS DANS LE STRIATUM DU RAT HÉMI-PARKINSONIEN TRAITÉ PAR LA L-DOPA

Deux jours avant le dernier test d'évaluation des mouvements dyskinétiques, les animaux sont soumis à une lésion du cortex ipsilatéral par thermo-coagulation. Le jour suivant ce test, ils sont sacrifiés et leurs striata sont soumis à diverses analyses neurochimiques afin de déterminer leurs contenus tissulaires en dopamine et en glutamate.

Les concentrations tissulaires de dopamine sont mesurées dans le striatum ipsilatéral d'animaux présentant ou non des dyskinésies en réponse au traitement par la L-DOPA et ayant ou non subi une lésion du cortex ipsilatéral. Les résultats sont exprimés en % des rapports [concentration de dopamine dans le striatum ipsilatéral] / [concentration de dopamine dans le striatum contralatéral]. Une analyse ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir de ces

données, avec [l'intensité des dyskinésies] et la [lésion corticale] comme facteurs, ne révèle aucune interaction entre les deux facteurs ([intensité des dyskinésies] x [lésion corticale] ; (F(1,80) = 0,495 ; p > 0,05). Plus précisément, cette analyse indique que, comparativement au

Concentration striatale de dopamine
(% des rapports [côté droit]/[côté gauche])

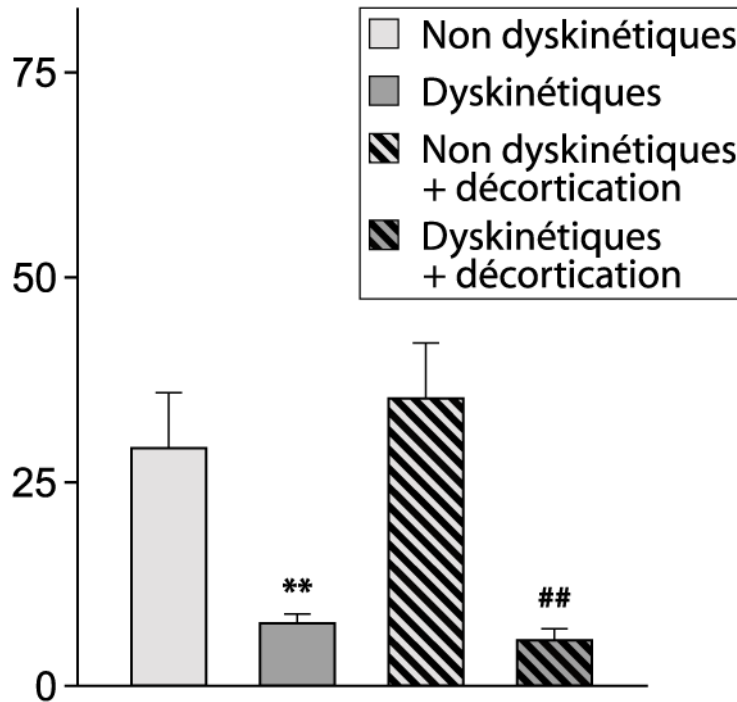


Figure 52 : Évaluation des concentrations tissulaires de dopamine dans le striatum d'animaux ayant subi, 5 semaines plus tôt, une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale et soumis ou non à une lésion du cortex ipsilatéral.

Deux semaines après la lésion unilatérale du MFB par injection de 6-OHDA, les animaux reçoivent, quotidiennement et pendant 3 semaines, une injection *i.p.* d'une solution composée de L-DOPA (6 mg/kg) et de benserazide (15 mg/kg). Deux jours avant la fin du traitement chronique, les animaux subissent une lésion du cortex par thermo-coagulation, de manière ipsilatérale par rapport à l'injection de 6-OHDA. À l'issue des 3 semaines de traitement, les concentrations tissulaires de dopamine sont évaluées à partir des striata ipsi- et contralatéraux. Pour chaque animal, les données sont exprimées en % des rapports [concentration de dopamine dans le striatum ipsilatéral]/[concentration de dopamine dans le striatum contralatéral]. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. ** P < 0,01 vs. groupe d'animaux non dyskinétiques ; ## P < 0,01 vs. groupe d'animaux non dyskinétiques soumis à la lésion du cortex ipsilatéral (n = 12 à 36).

groupe non dyskinétique correspondant, les concentrations striatales de dopamine sont significativement réduites chez les animaux dyskinétiques soumis (respectivement $5,6 \pm 1,4$ % vs. $35,2 \pm 6,8$ % ; - 84,1 % ; p < 0,01 ; n = 12) ou non à une lésion du cortex ipsilatéral

(respectivement $7,7 \pm 1,1$ % vs. $29,1 \pm 6,8$ % ; - 73,6 % ; $p < 0,01$; $n = 21$ et 36 , Figure 52). En revanche, comparativement aux animaux non lésés, la lésion du cortex ipsilatéral n'a aucun effet sur les concentrations de dopamine mesurées chez les animaux dyskinétiques (respectivement $7,7 \pm 1,1$ % vs. $5,6 \pm 1,4$ % ; $p > 0,05$; $n = 36$ et 12) et non dyskinétiques (respectivement $29,1 \pm 6,8$ % vs. $35,2 \pm 6,8$ % ; $p > 0,05$; $n = 21$ et 12).

Les mêmes expériences sont appliquées à la mesure des concentrations tissulaires de glutamate exprimées en % des rapports [concentration de glutamate dans le striatum ipsilatéral] / [concentration de glutamate dans le striatum ipsilatéral]. Une analyse ANOVA à 2 facteurs réalisée à partir de ces données, avec [l'intensité des dyskinésies] et la [lésion corticale] comme facteurs, ne révèle aucune interaction entre les deux facteurs ([intensité des dyskinésies] x [lésion corticale] ; $(F(1,80) = 0,0531$; $p > 0,05$). Plus précisément, cette analyse indique que, comparativement aux animaux non lésés, la destruction du cortex ipsilatéral diminue significativement les concentrations striatales de glutamate mesurées chez les animaux dyskinétiques (respectivement $97,4 \pm 2,3$ % vs. $57,5 \pm 3,5$ % ; - 41,0 % ; $p < 0,001$; $n = 36$ et 12) et non dyskinétiques (respectivement $98,4 \pm 4,2$ % vs. $60,4 \pm 6,1$ % ; - 38,6 % ; $p < 0,001$; $n = 21$ et 12 ; Figure 53). En revanche, comparativement aux animaux non dyskinétiques correspondants, les animaux dyskinétiques ne présentent aucune modification des concentrations tissulaires de glutamate mesurées au niveau du striatum ipsilatéral qu'ils soient soumis (respectivement $60,4 \pm 6,1$ % vs. $57,5 \pm 3,5$ % ; $p > 0,05$; $n = 12$) ou non à la lésion du cortex ipsilatéral (respectivement $98,4 \pm 4,2$ % vs. $97,4 \pm 2,3$ % ; $p > 0,05$; $n = 21$ et 36).

Les résultats de ces expériences confirment les données neurochimiques précédemment obtenues après lésion du cortex (*cf.* chapitres 3.1.1.2 et 3.1.1.3). En effet, les concentrations tissulaires de dopamine ne sont pas altérées par la lésion corticale, suggérant que cette

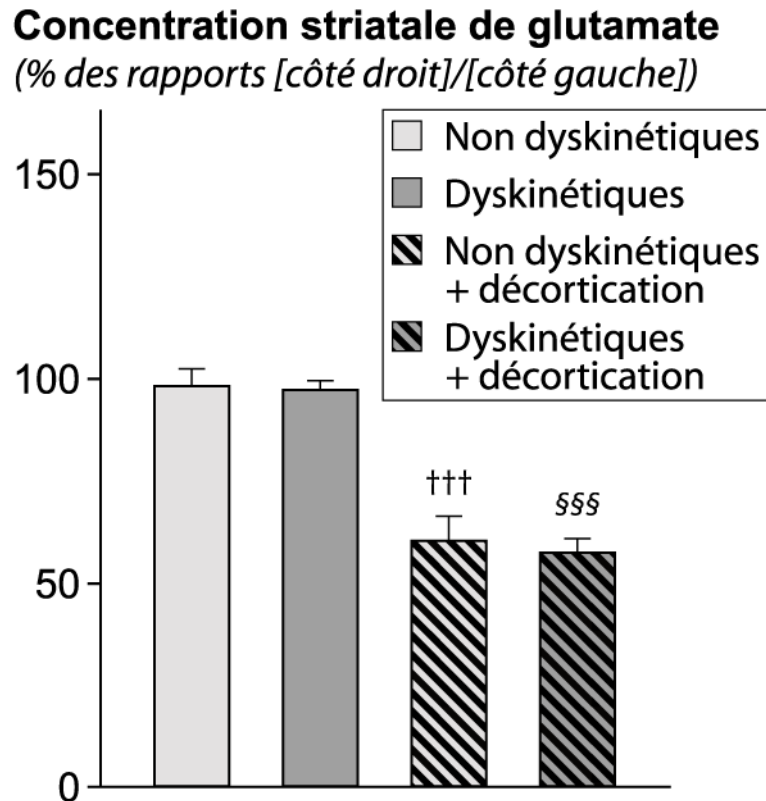


Figure 53 : Évaluation des concentrations tissulaires de glutamate dans le striatum d'animaux avant subi, 5 semaines plus tôt, une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale et soumis ou non à une lésion du cortex ipsilatéral.

Deux semaines après la lésion unilatérale du MFB par injection de 6-OHDA, les animaux reçoivent, quotidiennement et pendant 3 semaines, une injection *i.p.* d'une solution composée de L-DOPA (6 mg/kg) et de benserazide (15 mg/kg). À l'issue des 3 semaines de traitement, les concentrations tissulaires de glutamate sont évaluées à partir des striata ipsi- et contralatéraux. Pour chaque animal, les données sont exprimées en % des rapports [concentration de glutamate dans le striatum ipsilatéral]/[concentration de glutamate dans le striatum contralatéral]. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey ($n = 12$ à 36). ** $P < 0,01$ vs. groupe d'animaux non dyskinétiques ; ††† $< 0,001$ vs. groupe d'animaux non dyskinétiques non soumis à la lésion du cortex ipsilatéral ; §§§ $< 0,001$ vs. groupe d'animaux dyskinétiques non soumis à la lésion du cortex ipsilatéral ($n = 12$ à 36).

dernière préserve les neurones dopaminergiques. En revanche, les concentrations de glutamate sont réduites d'environ 40 % chez les animaux dyskinétiques et non dyskinétiques, attestant d'une destruction effective des neurones cortico-striataux.

4.4.1.2 EFFETS D'UNE ADMINISTRATION I.C.V. DE DPDPE SUR LES DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA CHEZ LE RAT HÉMI-PARKINSONNIEN SOUMIS OU NON À UNE LÉSION DES NEURONES CORTICO-STRIATAUX

À l'issue des 3 semaines de traitement chronique par la L-DOPA, des animaux dyskinétiques ayant subi ou non une lésion du cortex ipsilatéral par thermo-coagulation reçoivent, 10 min avant le test final, l'injection *i.c.v.* d'une solution de DPDPE (10 µg /5 µL) ou de soluté physiologique au débit de 12 µL/min. Comme l'indique la Figure 47, l'évolution des mouvements dyskinétiques est stable au cours des 2 sessions qui précèdent le test final dans lequel les animaux sont soumis aux traitements *i.c.v.* (tests 5 et 6). Une analyse ANOVA à 2 facteurs, réalisée à partir des données exprimées en % du résultat obtenu par chaque animal au test précédant l'injection *i.c.v.* de DPDPE, avec le [traitement par la DPDPE] et la [décortication] comme facteurs, révèle la présence d'une interaction entre les deux facteurs ([traitement DPDPE] x [décortication] ; $F(1,47) = 6,030$; $p = 0,018$). Plus précisément, cette analyse confirme que, comparativement à une injection *i.c.v.* de soluté physiologique, l'injection *i.c.v.* de DPDPE accroît significativement l'intensité des mouvements dyskinétiques induits par la L-DOPA (respectivement $103,3 \pm 6,5$ % vs. $136,5 \pm 10,1$ % ; + 32,1 % ; $p < 0,01$; $n = 12$; Figure 54). Au contraire, la lésion des neurones cortico-striataux induit une forte réduction des dyskinésies par rapport aux animaux contrôles (respectivement $59,1 \pm 9,6$ % vs. $103,3 \pm 6,5$ % ; - 42,8 % ; $p < 0,001$; $n = 12$; Figure 54). Par ailleurs, l'injection *i.c.v.* de DPDPE à des animaux dyskinétiques ayant subi une lésion des afférences cortico-striatales reste sans effet sur l'intensité des dyskinésies comparativement aux animaux décortiqués ayant reçu une injection *i.c.v.* de soluté physiologique (respectivement $50,9 \pm 7,0$ % vs. $59,1 \pm 9,6$ % ; $p > 0,05$; $n = 12$; Figure 54).

4.4.1.3 ÉVALUATION DE LA LIAISON STRIATALE DE [3H]-DPDPE CHEZ DES ANIMAUX HÉMI-PARKINSONIENS AYANT OU NON SUBI UNE LÉSION DES NEURONES CORTICO-STRIATAUX ET EXPRIMANT OU NON DES DYSKINÉSIES EN RÉPONSE AU TRAITEMENT PAR LA L-DOPA

La liaison de [3H]-DPDPE a été évaluée à la concentration de 4 nM sur des membranes préparées à partir du striatum entier, le lendemain du test au cours duquel sont effectuées les

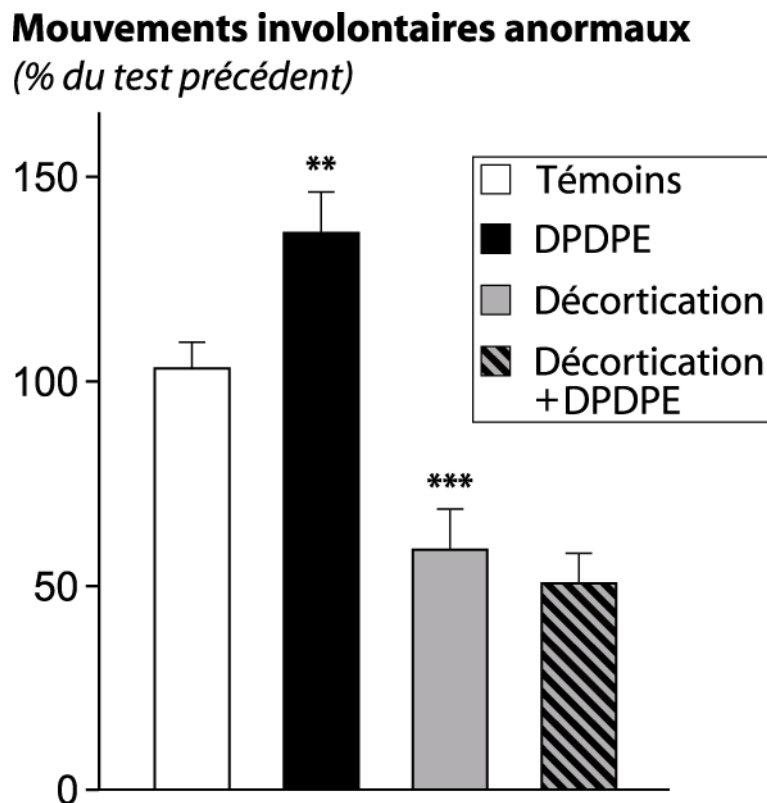


Figure 54 : Effets de la DPDPE sur les mouvements involontaires anormaux induits par la L-DOPA chez des animaux héli-parkinsoniens dyskinétiques soumis ou non à une lésion du cortex ipsilatéral.

Deux semaines après la lésion unilatérale du MFB par injection de 6-OHDA, les animaux reçoivent, quotidiennement et pendant 3 semaines, une injection *i.p.* d'une solution composée de L-DOPA (6 mg/kg) et de bensérazide (15 mg/kg). 20 min après le traitement, les animaux sont soumis à un test d'évaluation des mouvements involontaires anormaux, à raison de 2 tests consécutifs par semaine. Deux jours avant la fin du traitement chronique, les animaux subissent une lésion du cortex par thermo-coagulation, de manière ipsilatérale par rapport à l'injection de 6-OHDA. À l'issue des 3 semaines de traitement, les animaux reçoivent également, avant le test, une injection *i.c.v.* de DPDPE (10 µg). Les données sont, pour chaque animal, exprimées en % par rapport au résultat obtenu lors du test précédent. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. ** P < 0,01 ; *** P < 0,001 vs. groupe témoin dyskinétique ayant reçu une injection *i.c.v.* de soluté physiologique (n = 12).

injections *i.c.v.* de DPDPE. Une analyse ANOVA à 2 facteurs, avec l'intensité des dyskinésies et la décortication comme facteurs, révèle la présence d'une interaction entre [l'intensité des dyskinésies] et [la décortication] ($F(1,80) = 4,945$; $p = 0,029$). Plus précisément, cette analyse confirme un nombre de sites de liaison de la [^3H]-DPDPE plus important chez les animaux dyskinétiques comparativement aux animaux non dyskinétiques (respectivement $92,4 \pm 2,3$ % vs. $82,8 \pm 3,1$ % ; + 10,4 % ; $p < 0,01$; $n = 36$ et 21 ; Figure 55). En outre, elle révèle un effet de la lésion corticale sur le taux de radioliasion aux récepteurs δ ($F(1,80) = 17,994$; $p < 0,001$) et met en évidence un nombre significativement inférieur de récepteurs δ dans le striatum ipsilatéral des animaux dyskinétiques ayant subi une lésion des neurones glutamatergiques cortico-striataux comparativement au groupe d'animaux dyskinétiques non soumis à la destruction du cortex ipsilatéral (respectivement $72,4 \pm 2,3$ % vs. $92,4 \pm 2,3$ % ; - 21,6 % ; $p < 0,001$; $n = 36$ et 12 ; Figure 55).

Les résultats de ces expériences confirment l'implication des récepteurs opioïdes de type δ dans l'expression des dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat hémiparkinsonien. Ces données indiquent, en outre, que la lésion du cortex ipsilatéral diminue le nombre de récepteurs δ dans le striatum ipsilatéral des animaux dyskinétiques, annulant ainsi l'expression plus importante observée, en l'absence de décortication, chez ces animaux comparativement aux animaux non dyskinétiques. À l'instar des données obtenues dans la première partie de notre étude, ce résultat indique qu'une partie des récepteurs opioïdes de type δ sont localisés sur les terminaisons des neurones cortico-striataux. En revanche, chez les animaux non dyskinétiques, qui présentent un nombre plus faible de récepteurs δ par rapport aux animaux dyskinétiques, le taux de liaison de la [^3H]-DPDPE n'est pas altéré par la lésion corticale. Ce résultat suggère que les récepteurs δ exprimés en plus grand nombre chez les animaux dyskinétiques, et qui font défaut chez les animaux non dyskinétiques, pourraient précisément être portés par les terminaisons des neurones cortico-striataux. Cette

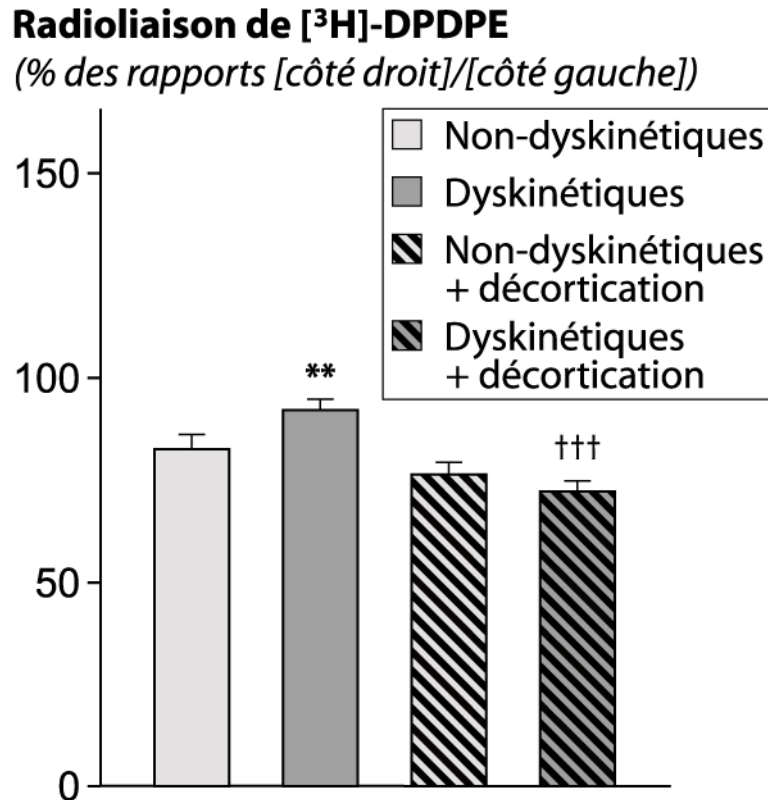


Figure 55 : Évaluation de la liaison de [^3H]-DPDPE chez des animaux ayant subi 5 semaines plus tôt une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale, traités à la L-DOPA et soumis ou non à une lésion du cortex ipsilatéral.

Deux semaines après la lésion unilatérale du MFB par injection de 6-OHDA, les animaux reçoivent, quotidiennement et pendant 3 semaines, une injection *i.p.* d'une solution composée de L-DOPA (6 mg/kg) et de benserazide (15 mg/kg). La lésion du cortex ipsilatéral est effectuée par thermo-coagulation deux jours avant la fin des 3 semaines de traitement. À l'issue du traitement, la radioliation de [^3H]-DPDPE (4 nM) est évaluée sur des suspensions de membranes préparées à partir des striata de ces animaux. Les données sont, pour chaque animal, exprimées en % des rapports [liaison spécifique dans le striatum ipsilatéral]/[liaison spécifique dans le striatum contralatéral]. Les moyennes \pm S.E.M. sont comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 facteurs suivie par un test de Tukey. ** $P < 0,01$ vs. groupe d'animaux non dyskinétiques ; ††† $P < 0,001$ vs. groupe d'animaux dyskinétiques (n = 12 à 36).

interprétation est parallèlement confortée sous un angle fonctionnel puisque la lésion du cortex ipsilatéral prévient également les effets stimulants de la DPDPE sur l'intensité des mouvements dyskinétiques induits par la L-DOPA. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les récepteurs δ impliqués dans la modulation des dyskinésies induites par la L-DOPA sont principalement exprimés par les terminaisons des neurones glutamatergiques cortico-striataux. Nos expériences neurochimiques indiquent que la stimulation des récepteurs

opioïdes de type δ provoque une augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate, en accord avec l'hypothèse d'une implication de la transmission glutamatergique striatale dans les dyskinésies induites par la L-DOPA. L'innervation glutamatergique au niveau du striatum est particulièrement riche et il est démontré que les substances affectant la transmission glutamatergique peuvent profondément affecter les fonctions motrices (Starr, 1995). Bien que tous les récepteurs glutamatergiques puissent probablement contribuer à l'expression des dyskinésies induites par la L-DOPA, les données actuellement disponibles concernent principalement les récepteurs ionotropiques de type NMDA dont l'expression est augmentée chez le patient parkinsonien et chez le Singe lésé par le MPTP et traité par la L-DOPA (Ulas et coll., 1994 ; Calon et coll., 2002b). D'un point de vue comportemental, l'administration systémique de MK801, un antagoniste sélectif de ces récepteurs, permet de prévenir les complications motrices résultant du traitement chronique par la L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien (Marin et coll., 1996). Chez le primate, le rémacémide (un autre antagoniste de ces récepteurs) améliore également les dyskinésies induites par la L-DOPA (Papa & Chase, 1996) et l'amantadine constitue à ce jour le traitement le plus efficace pour réduire les dyskinésies induites par la L-DOPA (Blanchet et coll., 1998 ; Rajput et coll., 1998 ; Del Dotto et coll., 2001). Comme l'indiquent par ailleurs nos expériences de lésion corticale, les effets induits par les antagonistes des récepteurs de type NMDA sur l'expression des mouvements dyskinétiques apparaissent impliquer principalement le striatum (Papa et coll., 1995), suggérant ainsi que la capacité de ces antagonistes à réduire l'intensité des dyskinésies puisse refléter une augmentation excessive de la transmission glutamatergique cortico-striatale. De plus, une augmentation du taux de phosphorylation des récepteurs NMDA a été mise en évidence chez le rat hémi-parkinsonien dyskinétique (Oh et coll., 1998 ; Dunah et coll., 2000).

En conclusion, les résultats de cette partie comportementale de notre étude ont permis de mettre en évidence l'implication des récepteurs opioïdes δ dans les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien. Ces récepteurs apparaissent moduler l'intensité de comportements dyskinétiques préexistants. Leur expression différente dans le striatum d'animaux dyskinétiques comparativement aux animaux non dyskinétiques suggère, en outre, que les systèmes opioïdes endogènes stimulant ces récepteurs puissent être différemment affectés par l'administration de L-DOPA. Il n'est cependant pas exclu que cette expression différentielle puisse ne pas résulter du traitement par la L-DOPA mais, au contraire, exercer un contrôle déterminant dans la survenue de ces troubles moteurs. Nos expériences indiquent également que les récepteurs δ qui modulent l'intensité des dyskinésies sont portés par les terminaisons des neurones glutamatergiques cortico-striataux. Nos expériences neurochimiques ont mis en évidence que la stimulation des récepteurs δ induit une augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate dans le striatum. Par ailleurs, de nombreuses études indiquent une augmentation de la transmission glutamatergique striatale dans le cadre des dyskinésies induites par la L-DOPA. L'effet inhibiteur du naltrindole et l'absence de récepteurs δ au niveau des terminaisons cortico-striatales chez les animaux non dyskinétiques suggèrent que ces récepteurs pourraient être impliqués dans le rôle probablement crucial joué par les neurones glutamatergiques cortico-striataux dans le développement des dyskinésies induites par la L-DOPA. Conjointement, nos résultats indiquent que la potentialisation exercée par la stimulation des récepteurs opioïdes δ sur l'expression des dyskinésies induites par L-DOPA pourrait en fait résulter d'une augmentation de la libération striatale de glutamate.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif du travail de recherche effectué dans le cadre de ma formation doctorale a initialement eu pour but d'approfondir des travaux, précédemment réalisés dans notre laboratoire, qui indiquaient que l'effet stimulant de la DPDPE sur la libération striatale de dopamine est aboli en présence d'un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (Dourmap & Costentin, 1994). Ce résultat suggérant l'implication des neurones glutamatergiques dans l'effet stimulant des récepteurs opioïdes de type δ sur la libération striatale de dopamine, nous avons mis en œuvre un protocole de lésion corticale compatible avec la technique de microdialyse intracérébrale, de manière à éprouver cette hypothèse *in vivo*, chez le Rat. Nos expériences montrent que la DPDPE augmente à la fois les concentrations extracellulaires de glutamate et de dopamine mais que ces effets sont tous deux abolis par la lésion du cortex ipsilatéral. Ces résultats confirment le rôle de la transmission glutamatergique, et plus particulièrement des neurones cortico-striataux, dans la libération striatale de dopamine résultant de la stimulation des récepteurs opioïdes de type δ . Nos expériences de radiolisation ont, par ailleurs, mis en évidence que certains récepteurs opioïdes de type δ apparaissent précisément localisés sur les terminaisons de ces neurones, suggérant un effet direct. Afin de préciser le mécanisme, nous avons recherché une contribution éventuelle des cellules gliales, dont l'activité est étroitement liée à celle des neurones glutamatergiques, dans les effets stimulants induits, dans le striatum, par la DPDPE. Grâce au L- α AA, une toxine dont les propriétés délétères, sélectivement dirigés contre les cellules gliales, ont été exploitées de manière précoce ou tardive (inactivation partielle ou totale), nous avons montré que les astrocytes ne sont pas directement impliqués dans la modulation exercée par les récepteurs δ sur l'augmentation des taux extracellulaires de glutamate et de dopamine. À notre connaissance le L- α AA n'avait, jusqu'alors, jamais été utilisé dans le cadre d'expériences de microdialyse intracérébrale chez l'animal éveillé. Bien que les données obtenues à des temps postlésionnels tardifs doivent être interprétées avec

précaution, en raison notamment de la forte altération du système de neurotransmission glutamatergique résultant d'une carence prolongée en glutamine, nos résultats indiquent que le L- α AA est un outil particulièrement adapté aux expériences de microdialyse qui nécessitent une inactivation des fonctions gliales. Nos dernières expériences, menées *in vivo* et *in vitro*, montrent enfin que les effets stimulants exercés par la DPDPE sur les taux de glutamate sont indépendants des transporteurs assurant, dans le striatum, la recapture de ce neurotransmetteur. Dans leur ensemble, ces données neurochimiques indiquent que la libération striatale de dopamine induite par la DPDPE est la conséquence d'une augmentation des taux extracellulaires de glutamate, selon un mécanisme présynaptique mettant en jeu des récepteurs opioïdes de type δ localisés sur les terminaisons des neurones cortico-striataux et résultant probablement d'une libération de glutamate. Cette interprétation s'oppose au concept, généralement admis, selon lequel les récepteurs opioïdes δ produiraient des effets essentiellement inhibiteurs (*pour revue* : Quock et coll., 1999). En accord avec cette notion, il a récemment été suggéré, à partir de coupes striatales, un effet inhibiteur de la DPDPE à l'égard des réponses électrophysiologiques postsynaptiques qui pourrait résulter d'une augmentation de la conductance des terminaisons cortico-striatales aux ions K^+ (Jose et coll., 2007). D'autres études, menées *in vitro* sur des systèmes cellulaires obtenus par transfection ou tumorigénèse, ont néanmoins indiqué que la stimulation des récepteurs opioïdes δ peut activer certaines voies de signalisation cellulaire, notamment celles mettant en jeu les MAP-kinases, la phospholipase de type C (PLC) ou encore le Ca^{2+} intracellulaire (*pour revue* : Smart & Lambert, 1996). *In vivo*, nos expériences montrent que les récepteurs δ peuvent générer des réponses physiologiques excitatrices. Nos résultats ne permettent cependant pas d'identifier précisément le ou les mécanisme(s) de signalisation cellulaire couplant l'activation des récepteurs opioïdes δ portés par les terminaisons cortico-striatales et la libération de glutamate qui en résulte. Dans ce but, il pourrait par exemple être intéressant de

recourir à la technique de patch-clamp, pour déterminer si l'application de DPDPE dans l'environnement immédiat d'une terminaison glutamatergique est capable d'induire ou non une réponse électrophysiologique positive et, le cas échéant, d'identifier la nature de cet effet (ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été étudié). Les mécanismes de transduction impliqués la libération de glutamate induite par la DPDPE pourraient être également identifiés à partir de cultures de neurones glutamatergiques, grâce aux techniques biochimiques classiquement utilisées dans l'étude des processus de signalisation intracellulaire.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons exploré par une approche comportementale les hypothèses résultant de nos expériences neurochimiques. Le modèle des dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien nous est apparu particulièrement adapté à cet objectif puisque, outre une hypothèse purement dopaminergique, de nombreuses données cliniques et expérimentales suggèrent l'implication de la transmission glutamatergique striatale dans la physiopathologie de ces mouvements involontaires et anormaux (*pour revues* : Brotchie et coll., 2005 ; Deogaonkar & Subramanian, 2005). Les expériences que nous avons menées dans ce contexte montrent, à notre connaissance pour la première fois chez le Rat, que la DPDPE et le naltrindole administrés par voie *i.c.v.* potentialise et inhibe respectivement l'expression des dyskinésies induites par la L-DOPA sur fond d'une déafférentation nigro-striatale opérée par l'injection unilatérale de 6-OHDA. Ces résultats sont cohérents avec l'effet similaire du naltrindole sur les mouvements dyskinétiques induits, chez le primate, par la L-DOPA (Henri et coll., 2001). Nos données confirment ainsi l'intérêt thérapeutique que pourraient représenter les antagonistes des récepteurs opioïdes de type δ dans l'amélioration des troubles moteurs associés, chez le patient parkinsonien, au traitement par la L-DOPA. Nos résultats indiquent également que, comparativement aux animaux dyskinétiques, le nombre de récepteurs opioïdes de type δ dans le striatum ipsilatéral des animaux épargnés par l'effet adverse de la L-DOPA est réduit de manière significative.

Cette absence de diminution d'expression des récepteurs opioïdes δ dans le striatum ipsilatéral des animaux dyskinétiques hémi-parkinsoniens constitue une hypothèse neurochimique pertinente dans la physiopathologie des dyskinésies induites par la L-DOPA. Par ailleurs, de nombreuses données expérimentales et cliniques suggèrent une hyperactivité de la transmission glutamatergique cortico-striatale dans les dyskinésies (Brotchie et coll., 2005). En montrant qu'une déafférentation cortico-striatale réduit l'expression des mouvements dyskinétiques, nos résultats confirment par conséquent cette notion. Nous montrons, en outre, que la lésion du cortex diminue significativement la densité des récepteurs δ dans le striatum ipsilatéral des animaux dyskinétiques, rejoignant ainsi les niveaux d'expression observés chez les animaux non dyskinétiques, et abolit l'effet stimulant de la DPDPE sur l'intensité des mouvements dyskinétiques. Les récepteurs opioïdes δ impliqués dans la modulation des dyskinésies induites par la L-DOPA pourraient ainsi être précisément portés par les terminaisons des neurones cortico-striataux, confirmant par ailleurs nos précédentes observations. Conjointement aux résultats de nos expériences neurochimiques, ces données nous permettent de proposer une hypothèse physiopathologique des dyskinésies induites par la L-DOPA dans laquelle la déafférentation nigro-striatale, associée à la stimulation non physiologique des récepteurs dopaminergiques, induirait une hyperactivation progressive de la transmission glutamatergique striatale. Chez les animaux non dyskinétiques, il en résulterait divers mécanismes adaptatifs visant à compenser cette hyperactivité, parmi lesquels une diminution de l'expression striatale des récepteurs opioïdes de type δ qui, dans les conditions normales, participent de manière tonique à l'entretien des taux extracellulaires de glutamate. Les dyskinésies apparaîtraient alors lorsque ces mécanismes compensateurs ne peuvent s'exprimer ou ne sont plus efficaces. Nous ne pouvons néanmoins exclure l'éventualité que cette diminution du nombre de récepteurs opioïdes de type δ ne soit pas la conséquence d'un phénomène adaptatif mais qu'elle puisse

représenter une variabilité interindividuelle préexistante qui déterminerait l'apparition ou non des dyskinésies. Pour répondre à cette question, il pourrait être intéressant de déterminer si les mouvements dyskinétiques induits par la L-DOPA peuvent apparaître chez des animaux présentant, avant le début du traitement, une diminution du nombre de récepteurs opioïdes δ . À cet effet, une lésion corticale pourrait, par exemple, être utilisée. Sous réserve qu'il soit possible de transposer chez la souris le modèle expérimental des dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat hémi-parkinsonien, cette hypothèse pourrait également être testée chez des souris « knock-out » n'exprimant pas les récepteurs opioïdes de type δ . Enfin, il pourrait s'avérer pertinent de rechercher si l'expression des récepteurs opioïdes δ évolue ou non en fonction du temps chez les animaux exprimant ou non des dyskinésies en réponse au traitement par la L-DOPA.

Notre travail permet d'élargir la connaissance des interactions entre les récepteurs δ et les deux principaux systèmes de transmission du striatum. Il confirme, en outre, les intéressantes perspectives thérapeutiques que laissent entrevoir les antagonistes de ces récepteurs dans le traitement des mouvements dyskinétiques provoqués, chez le malade parkinsonien, par la L-DOPA thérapie.

6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aizman O., Brismar H., Uhlen P., Zettergren E., Levey A.I., Forssberg H., Greengard P. & Aperia A. (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci*, **3**, 226-230.
- Alagarsamy S., Marino M.J., Rouse S.T., Gereau R.W.t., Heinemann S.F. & Conn P.J. (1999) Activation of NMDA receptors reverses desensitization of mGluR5 in native and recombinant systems. *Nat Neurosci*, **2**, 234-240.
- Albani D., Peverelli E., Rametta R., Batelli S., Veschini L., Negro A. & Forloni G. (2004) Protective effect of TAT-delivered alpha-synuclein: relevance of the C-terminal domain and involvement of HSP70. *Faseb J*, **18**, 1713-1715.
- Albin R.L., Young A.B. & Penney J.B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, **12**, 366-375.
- Alexander G.E. & Crutcher M.D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*, **13**, 266-271.
- Al-Hallaq R.A., Jarabek B.R., Fu Z., Vicini S., Wolfe B.B. & Yasuda R.P. (2002) Association of NR3A with the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 and NR2 subunits. *Mol Pharmacol*, **62**, 1119-1127.
- Allouche S., Polastron J. & Jauzac P. (1996) The delta-opioid receptor regulates activity of ryanodine receptors in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE. *J Neurochem*, **67**, 2461-2470.
- Alonso-Frech F., Zamarbide I., Alegre M., Rodriguez-Oroz M.C., Guridi J., Manrique M., Valencia M., Artieda J. & Obeso J.A. (2006) Slow oscillatory activity and levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Brain*, **129**, 1748-1757.
- Andersen S.L. & Gazzara R.A. (1993) The ontogeny of apomorphine-induced alterations of neostriatal dopamine release: effects on spontaneous release. *J Neurochem*, **61**, 2247-2255.
- Andersson M., Hilbertson A. & Cenci M.A. (1999) Striatal fosB expression is causally linked with l-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **6**, 461-474.
- Andersson M., Konradi C. & Cenci M.A. (2001) cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the dopamine-denervated striatum. *J Neurosci*, **21**, 9930-9943.
- Anglade P., Vyas S., Hirsch E.C. & Agid Y. (1997) Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol Histopathol*, **12**, 603-610.

-
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P. & Haydon P.G. (1998) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, **10**, 2129-2142.
- Arneric S.P., Meeley M.P. & Reis D.J. (1986) Met-enkephalin selectively increases the spontaneous release of amino acid neurotransmitters from rat striatal slices. *Neurosci Lett*, **66**, 73-78.
- Aubert I., Guigoni C., Hakansson K., Li Q., Dovero S., Barthe N., Bioulac B.H., Gross C.E., Fisone G., Bloch B. & Bezard E. (2005) Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol*, **57**, 17-26.
- Backlund E.O., Granberg P.O., Hamberger B., Knutsson E., Martensson A., Sedvall G., Seiger A. & Olson L. (1985) Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J Neurosurg*, **62**, 169-173.
- Bak L.K., Schousboe A. & Waagepetersen H.S. (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*, **98**, 641-653.
- Baker D.A., Xi Z.X., Shen H., Swanson C.J. & Kalivas P.W. (2002) The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci*, **22**, 9134-9141.
- Bannai S. (1986) Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J Biol Chem*, **261**, 2256-2263.
- Barch D.M. (2004) Pharmacological manipulation of human working memory. *Psychopharmacology (Berl)*, **174**, 126-135.
- Beal M.F. (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 325-334.
- Beart P.M. & O'Shea R.D. (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol*, **150**, 5-17.
- Behrens P.F., Franz P., Woodman B., Lindenberg K.S. & Landwehrmeyer G.B. (2002) Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain*, **125**, 1908-1922.
- Bellocchio E.E., Reimer R.J., Fremeau R.T., Jr. & Edwards R.H. (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*, **289**, 957-960.
- Benjamin A.M. & Quastel J.H. (1972) Locations of amino acids in brain slices from the rat. Tetrodotoxin-sensitive release of amino acids. *Biochem J*, **128**, 631-646.
- Berendse H.W. & Groenewegen H.J. (1990) Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J Comp Neurol*, **299**, 187-228.

- Berl S. & Clarke D.D. (1983) The metabolic compartmentation concept. In Herts L, K.E., McGeer EG, Shousboe A, eds (ed.) *Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous System* Liss, New York, pp. 205-217
- Bertler A. & Rosengren E. (1959) Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia*, **15**, 10-11.
- Betarbet R., Turner R., Chockkan V., DeLong M.R., Allers K.A., Walters J., Levey A.I. & Greenamyre J.T. (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J Neurosci*, **17**, 6761-6768.
- Bezard E., Brotchie J.M. & Gross C.E. (2001) Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 577-588.
- Billet F., Dourmap N. & Costentin J. (2004) Involvement of corticostriatal glutamatergic terminals in striatal dopamine release elicited by stimulation of delta-opioid receptors. *Eur J Neurosci*, **20**, 2629-2638.
- Björklund A. & Lindvall O. (1984) Dopamine-containing systems in the CNS. In Björklund, A.H.T. (ed.) *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, pp. 55-122.
- Blanchet P.J., Allard P., Gregoire L., Tardif F. & Bedard P.J. (1996) Risk factors for peak dose dyskinesia in 100 levodopa-treated parkinsonian patients. *Can J Neurol Sci*, **23**, 189-193.
- Blanchet P.J., Konitsiotis S. & Chase T.N. (1998) Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Mov Disord*, **13**, 798-802.
- Blandini F., Nappi G., Tassorelli C. & Martignoni E. (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, **62**, 63-88.
- Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A.L., Sadoul R. & Verna J.M. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, **65**, 135-172.
- Bodis-Wollner I. (2003) Neuropsychological and perceptual defects in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, **9** (2), S83-89.
- Bodnar R.J. & Klein G.E. (2006) Endogenous opiates and behavior: 2005. *Peptides*, **27**, 3391-3478.
- Bolam J.P. & Smith Y. (1990) The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res*, **529**, 57-78.
- Bonuccelli U., Colzi A. & Del Dotto P. (2002) Pergolide in the treatment of patients with early and advanced Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*, **25**, 1-10.

-
- Bordet R., Ridray S., Carboni S., Diaz J., Sokoloff P. & Schwartz J.C. (1997) Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3363-3367.
- Bowers M.S. & Kalivas P.W. (2003) Forebrain astroglial plasticity is induced following withdrawal from repeated cocaine administration. *Eur J Neurosci*, **17**, 1273-1278.
- Boyeson M.G. & Feeney D.M. (1985) Striatal dopamine after cortical injury. *Exp Neurol*, **89**, 479-483.
- Braak H., Del Tredici K., Rub U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N. & Braak E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, **24**, 197-211.
- Braak H., de Vos R.A., Bohl J. & Del Tredici K. (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*, **396**, 67-72.
- Bradford H.F., Ward H.K. & Thomas A.J. (1978) Glutamine: a major substrate for nerve endings. *J Neurochem.*, **30**, 1453-1459.
- Bradford H.F. (1986) Two excitatory amino acids : glutamate and aspartate. In Compagny, F.W.H. (ed.) *Chemical neurobiology : an introduction to neurochemistry*, New-York, pp. 211-229.
- Brennan L., Hewage C., Malthouse J.P. & McBean G.J. (2004) Gliotoxins disrupt alanine metabolism and glutathione production in C6 glioma cells: a ¹³C NMR spectroscopic study. *Neurochem Int*, **45**, 1155-1165.
- Bridges R.J., Hatalski C.G., Shim S.N., Cummings B.J., Vijayan V., Kundi A. & Cotman C.W. (1992) Gliotoxic actions of excitatory amino acids. *Neuropharmacology*, **31**, 899-907.
- Bridges R.J. & Esslinger C.S. (2005) The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacol Ther*, **107**, 271-285.
- Brotchie J.M. & Fox S.H. (1999) Quantitative assessment of dyskinesias in subhuman primates. *Mov Disord*, **14** (1), 40-47.
- Brotchie J.M., Lee J. & Venderova K. (2005) Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *J Neural Transm*, **112**, 359-391.
- Brown J.R. & Arbuthnott G.W. (1983) The electrophysiology of dopamine (D2) receptors: a study of the actions of dopamine on corticostriatal transmission. *Neuroscience*, **10**, 349-355.
- Brown P. & Williams D. (2005) Basal ganglia local field potential activity: character and functional significance in the human. *Clin Neurophysiol*, **116**, 2510-2519.

- Burt A.R., Carr I.C., Mullaney I., Anderson N.G. & Milligan G. (1996) Agonist activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases following expression of the mouse delta opioid receptor in Rat-1 fibroblasts: effects of receptor expression levels and comparisons with G-protein activation. *Biochem J*, **320** (1), 227-235.
- Butcher S.P. & Hamberger A. (1987) In vivo studies on the extracellular, and veratrine-releasable, pools of endogenous amino acids in the rat striatum: effects of corticostriatal deafferentation and kainic acid lesion. *J Neurochem*, **48**, 713-721.
- Cahill C.M., White T.D. & Sawynok J. (1996) Synergy between mu/delta-opioid receptors mediates adenosine release from spinal cord synaptosomes. *Eur J Pharmacol*, **298**, 45-49.
- Calabresi P., Mercuri N.B., Sancesario G. & Bernardi G. (1993) Electrophysiology of dopamine-denervated striatal neurons. Implications for Parkinson's disease. *Brain*, **116** (Pt 2), 433-452.
- Calenco-Choukroun G., Dauge V., Gacel G., Feger J. & Roques B.P. (1991) Opioid delta agonists and endogenous enkephalins induce different emotional reactivity than mu agonists after injection in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)*, **103**, 493-502.
- Calon F., Grondin R., Morissette M., Goulet M., Blanchet P.J., Di Paolo T. & Bedard P.J. (2000) Molecular basis of levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol*, **47**, S70-78.
- Calon F., Birdi S., Rajput A.H., Hornykiewicz O., Bedard P.J. & Di Paolo T. (2002a) Increase of preproenkephalin mRNA levels in the putamen of Parkinson disease patients with levodopa-induced dyskinesias. *J Neuropathol Exp Neurol*, **61**, 186-196.
- Calon F., Morissette M., Ghribi O., Goulet M., Grondin R., Blanchet P.J., Bedard P.J. & Di Paolo T. (2002) Alteration of glutamate receptors in the striatum of dyskinetic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys following dopamine agonist treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **26**, 127-138.
- Calon F., Dridi M., Hornykiewicz O., Bedard P.J., Rajput A.H. & Di Paolo T. (2004) Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain*, **127**, 1075-1084.
- Carlsson A. (1959) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev*, **11**, 490-493.
- Carmichael S.T. & Chesselet M.F. (2002) Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *J Neurosci*, **22**, 6062-6070.
- Carpentier A.F., Bonnet A.M., Vidailhet M. & Agid Y. (1996) Improvement of levodopa-induced dyskinesia by propranolol in Parkinson's disease. *Neurology*, **46**, 1548-1551.

-
- Cenci M.A., Lee C.S. & Bjorklund A. (1998) L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci*, **10**, 2694-2706.
- Cenci M.A. (2002) Transcription factors involved in the pathogenesis of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Amino Acids*, **23**, 105-109.
- Cenci M.A., Whishaw I.Q. & Schallert T. (2002) Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci*, **3**, 574-579.
- Cenci M.A. (2007) Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends Neurosci*, **30**, 236-243.
- Cepeda C., Wu N., Andre V.M., Cummings D.M. & Levine M.S. (2007) The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*, **81**, 253-271.
- Cerruti C., Drian M.J., Kamenka J.M. & Privat A. (1991) Localization of dopamine carriers by BTCP, a dopamine uptake inhibitor, on nigral cells cultured in vitro. *Brain Res*, **555**, 51-57.
- Cesar M. & Hamprecht B. (1995) Immunocytochemical examination of neural rat and mouse primary cultures using monoclonal antibodies raised against pyruvate carboxylase. *J Neurochem*, **64**, 2312-2318.
- Charles A.K. & Chang Y.F. (1981) Uptake, release, and metabolism of D- and L-alpha-amino acid by rat cerebral cortex. *J Neurochem*, **36**, 1127-1136.
- Chase T.N. (1998) Levodopa therapy: consequences of the nonphysiologic replacement of dopamine. *Neurology*, **50**, S17-25.
- Chen C.J., Liao S.L. & Kuo J.S. (2000) Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *J Neurochem*, **75**, 1557-1565.
- Chen W., Aoki C., Mahadomrongkul V., Gruber C.E., Wang G.J., Blitzblau R., Irwin N. & Rosenberg P.A. (2002) Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J Neurosci*, **22**, 2142-2152.
- Chen W., Mahadomrongkul V., Berger U.V., Bassan M., DeSilva T., Tanaka K., Irwin N., Aoki C. & Rosenberg P.A. (2004) The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci*, **24**, 1136-1148.
- Cheng H.W., Jiang T., Brown S.A., Pasinetti G.M., Finch C.E. & McNeill T.H. (1994) Response of striatal astrocytes to neuronal deafferentation: an immunocytochemical and ultrastructural study. *Neuroscience*, **62**, 425-439.

- Cheng H.W., Jiang T., Mori N. & McNeill T.H. (1997) Upregulation of stathmin (p19) gene expression in adult rat brain during injury-induced synapse formation. *Neuroreport*, **8**, 3691-3695.
- Chesselet M.F., Cheramy A., Reisine T.D. & Glowinski J. (1981) Morphine and delta-opiate agonists locally stimulate in vivo dopamine release in cat caudate nucleus. *Nature*, **291**, 320-322.
- Chesselet M.F. & Delfs J.M. (1996) Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci*, **19**, 417-422.
- Clapham D.E. & Neer E.J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **37**, 167-203.
- Clark D. & White F.J. (1987) D1 dopamine receptor - the search for a function: a critical evaluation of the D1/D2 dopamine receptor classification and its functional implications. *Synapse*, **1**, 347-388.
- Clark B.A. & Barbour B. (1997) Currents evoked in Bergmann glial cells by parallel fibre stimulation in rat cerebellar slices. *J Physiol*, **502** (2), 335-350.
- Clarke C.E., Sambrook M.A., Mitchell I.J. & Crossman A.R. (1987) Levodopa-induced dyskinesia and response fluctuations in primates rendered parkinsonian with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *J Neurol Sci*, **78**, 273-280.
- Clarke V.R., Ballyk B.A., Hoo K.H., Mandelzys A., Pellizzari A., Bath C.P., Thomas J., Sharpe E.F., Davies C.H., Ornstein P.L., Schoepp D.D., Kamboj R.K., Collingridge G.L., Lodge D. & Bleakman D. (1997) A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature*, **389**, 599-603.
- Clements J.D., Lester R.A., Tong G., Jahr C.E. & Westbrook G.L. (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science*, **258**, 1498-1501.
- Conn P.J., Battaglia G., Marino M.J. & Nicoletti F. (2005) Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 787-798.
- Corsi C., Pinna A., Gianfriddo M., Melani A., Morelli M. & Pedata F. (2003) Adenosine A2A receptor antagonism increases striatal glutamate outflow in dopamine-denervated rats. *Eur J Pharmacol*, **464**, 33-38.
- Corvol J.C., Muriel M.P., Valjent E., Feger J., Hanoun N., Girault J.A., Hirsch E.C. & Herve D. (2004) Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *J Neurosci*, **24**, 7007-7014.
- Cossette M., Lecomte F. & Parent A. (2005) Morphology and distribution of dopaminergic neurons intrinsic to the human striatum. *J Chem Neuroanat*, **29**, 1-11.

-
- Costentin J. (1991) [Brain dopamine receptors. Interactions between D1 and D2 receptors, and dopamine mediated behaviour]. *Therapie*, **46**, 269-282.
- Cotzias G.C., Papavasiliou P.S. & Gellene R. (1969) L-dopa in parkinson's syndrome. *N Engl J Med*, **281**, 272.
- Cowan R.L. & Wilson C.J. (1994) Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *J Neurophysiol*, **71**, 17-32.
- Cozzens J.W. (2007) Surgery for Parkinson's disease. *Dis Mon*, **53**, 227-242.
- Creese I. & Iversen S.D. (1973) Blockage of amphetamine induced motor stimulation and stereotypy in the adult rat following neonatal treatment with 6-hydroxydopamine. *Brain Res*, **55**, 369-382.
- Daikhin Y. & Yudkoff M. (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr*, **130**, 1026S-1031S.
- Danbolt N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, **65**, 1-105.
- Das D., Rogers J. & Michael-Titus A.T. (1994) Comparative study of the effects of mu, delta and kappa opioid agonists on 3H-dopamine uptake in rat striatum and nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, **33**, 221-226.
- Davie C.A., Pirtosek Z., Barker G.J., Kingsley D.P., Miller P.H. & Lees A.J. (1995) Magnetic resonance spectroscopic study of parkinsonism related to boxing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **58**, 688-691.
- de Ceballos M.L., Fernandez A., Jenner P. & Marsden C.D. (1993) Parallel alterations in Met-enkephalin and substance P levels in medial globus pallidus in Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*, **160**, 163-166.
- de Ceballos M.L. & Lopez-Lozano J.J. (1999) Subgroups of parkinsonian patients differentiated by peptidergic immunostaining of caudate nucleus biopsies. *Peptides*, **20**, 249-257.
- de Lau L.M., Giesbergen P.C., de Rijk M.C., Hofman A., Koudstaal P.J. & Breteler M.M. (2004) Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. *Neurology*, **63**, 1240-1244.
- De Vries T.J., Schoffelmeer A.N., Delay-Goyet P., Roques B.P. & Mulder A.H. (1989) Selective effects of [D-Ser2(O-t-butyl),Leu5]enkephalyl-Thr6 and [D-Ser2(O-t-butyl),Leu5]enkephalyl-Thr6 (O-t-butyl), two new enkephalin analogues, on neurotransmitter release and adenylate cyclase in rat brain slices. *Eur J Pharmacol*, **170**, 137-143.

- Del Arco A., Segovia G., Fuxe K. & Mora F. (2003) Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J Neurochem*, **85**, 23-33.
- Del Dotto P., Pavese N., Gambaccini G., Bernardini S., Metman L.V., Chase T.N. & Bonuccelli U. (2001) Intravenous amantadine improves levodopa-induced dyskinesias: an acute double-blind placebo-controlled study. *Mov Disord*, **16**, 515-520.
- DeLong M.R. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*, **13**, 281-285.
- Deng Y.P., Xie J.P., Wang H.B., Lei W.L., Chen Q. & Reiner A. (2007) Differential localization of the GluR1 and GluR2 subunits of the AMPA-type glutamate receptor among striatal neuron types in rats. *J Chem Neuroanat*, **33**, 167-192.
- Deniau J.M., Menetrey A. & Charpier S. (1996) The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. *Neuroscience*, **73**, 761-781.
- Deogaonkar M. & Subramanian T. (2005) Pathophysiological basis of drug-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, **50**, 156-168.
- Desce J.M., Godeheu G., Galli T., Artaud F., Cheramy A. & Glowinski J. (1992) L-glutamate-evoked release of dopamine from synaptosomes of the rat striatum: involvement of AMPA and N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*, **47**, 333-339.
- Desole M.S., Miele M., Enrico P., Esposito G., Fresu L., De Natale G. & Miele E. (1992) Effects of cortical ablation on apomorphine- and scopolamine-induced changes in dopamine turnover and ascorbic acid catabolism in the rat striatum. *Eur J Pharmacol*, **219**, 67-74.
- Deumens R., Blokland A. & Prickaerts J. (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, **175**, 303-317.
- Dhawan B.N., Cesselin F., Raghbir R., Reisine T., Bradley P.B., Portoghese P.S. & Hamon M. (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev*, **48**, 567-592.
- Di Chiara G. (1990) In-vivo brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 116-121.
- Di Garbo A., Barbi M., Chillemi S., Alloisio S. & Nobile M. (2007) Calcium signalling in astrocytes and modulation of neural activity. *Biosystems*, **89**, 74-83.
- Diamond J.S. & Jahr C.E. (2000) Synaptically released glutamate does not overwhelm transporters on hippocampal astrocytes during high-frequency stimulation. *J Neurophysiol*, **83**, 2835-2843.

-
- Dilts R.P. & Kalivas P.W. (1990) Autoradiographic localization of delta opioid receptors within the mesocorticolimbic dopamine system using radioiodinated [2-D-penicillamine, 5-D-penicillamine]enkephalin (125I-DPDPE). *Synapse*, **6**, 121-132.
- Dingledine R., Borges K., Bowie D. & Traynelis S.F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, **51**, 7-61.
- Disbrow J.K., Gershten M.J. & Ruth J.A. (1982) Uptake of L-[3H] glutamic acid by crude and purified synaptic vesicles from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, **108**, 1221-1227.
- Divac I., Fonnum F. & Storm-Mathisen J. (1977) High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature*, **266**, 377-378.
- Domesick V.B. (1981) The anatomical basis for feedback and feedforward in striatonigral system. In Gesser GL & Corsini V, E. (ed.) *Apomorphine and other dopaminomimetics: Basic Pharmacology*. Raven Press, New York, pp. 27-39.
- Donoghue J.P. & Herkenham M. (1986) Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res*, **365**, 397-403.
- Dourmap N., Michael-Titus A. & Costentin J. (1990) Local enkephalins tonically modulate dopamine release in the striatum: a microdialysis study. *Brain Res*, **524**, 153-155.
- Dourmap N., Michael-Titus A. & Costentin J. (1991) Presynaptic modulation of striatal dopamine release by enkephalins. *Adv Biosci*, **82**, 101-102.
- Dourmap N., Michael-Titus A. & Costentin J. (1992) Differential effect of intrastriatal kainic acid on the modulation of dopamine release by mu- and delta-opioid peptides: a microdialysis study. *J. Neurochem.*, **58**, 709-713.
- Dourmap N. & Costentin J. (1994) Involvement of glutamate receptors in the striatal enkephalin-induced dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.*, **253**, R9-11.
- Drew K.L., Pehek E.A., Rasley B.T., Ma Y.L. & Green T.K. (2004) Sampling glutamate and GABA with microdialysis: suggestions on how to get the dialysis membrane closer to the synapse. *J Neurosci Methods*, **140**, 127-131.
- Dunah A.W., Wang Y., Yasuda R.P., Kameyama K., Haganir R.L., Wolfe B.B. & Standaert D.G. (2000) Alterations in subunit expression, composition, and phosphorylation of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Mol Pharmacol*, **57**, 342-352.
- Duty S., Henry B., Crossman A.R. & Brotchie J.M. (1998) Topographical organization of opioid peptide precursor gene expression following repeated apomorphine treatment in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Exp Neurol*, **150**, 223-234.

- Eghbali M., Santoro C., Paredes W., Gardner E.L. & Zukin R.S. (1987) Visualization of multiple opioid-receptor types in rat striatum after specific mesencephalic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6582-6586.
- Ehrengruber M.U., Kato A., Inokuchi K. & Hennou S. (2004) Homer/Vesl proteins and their roles in CNS neurons. *Mol Neurobiol*, **29**, 213-227.
- Elbaz A., Levecque C., Clavel J., Vidal J.S., Richard F., Amouyel P., Alperovitch A., Chartier-Harlin M.C. & Tzourio C. (2004) CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **55**, 430-434.
- Engber T.M., Susel Z., Kuo S., Gerfen C.R. & Chase T.N. (1991) Levodopa replacement therapy alters enzyme activities in striatum and neuropeptide content in striatal output regions of 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res*, **552**, 113-118.
- Erickson J.D. & Eiden L.E. (1993) Functional identification and molecular cloning of a human brain vesicle monoamine transporter. *J Neurochem*, **61**, 2314-2317.
- Eriksson P.S., Hansson E. & Ronnback L. (1990) Delta and kappa opiate receptors in primary astroglial cultures from rat cerebral cortex. *Neurochem Res*, **15**, 1123-1126.
- Evans C.J., Keith D.E., Jr., Morrison H., Magendzo K. & Edwards R.H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, **258**, 1952-1955.
- Fearnley J.M. & Lees A.J. (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, **114** (5), 2283-2301.
- Feenstra M.G. & Botterblom M.H. (1996) Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. *Brain Res*, **742**, 17-24.
- Fellin T. & Carmignoto G. (2004) Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol*, **559**, 3-15.
- Fernandez A., de Ceballos M.L., Jenner P. & Marsden C.D. (1994) Neurotensin, substance P, delta and mu opioid receptors are decreased in basal ganglia of Parkinson's disease patients. *Neuroscience*, **61**, 73-79.
- Fernandez A., de Ceballos M.L., Rose S., Jenner P. & Marsden C.D. (1996) Alterations in peptide levels in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Brain*, **119** (3), 823-830.
- Ferraguti F. & Shigemoto R. (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res*, **326**, 483-504.

-
- Fletcher E.J. & Johnston G.A. (1991) Regional heterogeneity of L-glutamate and L-aspartate high-affinity uptake systems in the rat CNS. *J Neurochem*, **57**, 911-914.
- Floresco S.B., West A.R., Ash B., Moore H. & Grace A.A. (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci*, **6**, 968-973.
- Foffani G., Ardolino G., Meda B., Egidi M., Rampini P., Caputo E., Baselli G. & Priori A. (2005) Altered subthalamo-pallidal synchronisation in parkinsonian dyskinesias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **76**, 426-428.
- Fonnum F. (1985) Determination of amino acid turnover. *Neuromethods*, **3**, 201-237.
- Fonseca L.L., Monteiro M.A., Alves P.M., Carrondo M.J. & Santos H. (2005) Cultures of rat astrocytes challenged with a steady supply of glutamate: new model to study flux distribution in the glutamate-glutamine cycle. *Glia*, **51**, 286-296.
- Forno L.S. (1969) Concentric hyalin intraneuronal inclusions of Lewy type in the brains of elderly persons (50 incidental cases): relationship to parkinsonism. *J Am Geriatr Soc*, **17**, 557-575.
- Freed C.R., Greene P.E., Breeze R.E., Tsai W.Y., DuMouchel W., Kao R., Dillon S., Winfield H., Culver S., Trojanowski J.Q., Eidelberg D. & Fahn S. (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*, **344**, 710-719.
- Freund T.F., Powell J.F. & Smith A.D. (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience*, **13**, 1189-1215.
- Fritschi J.A., Lauterburg T. & Burgunder J.M. (2003) Expression of neurotransmitter genes in motor regions of the dyskinetic rat after iminodipropionitrile. *Neurosci Lett*, **347**, 45-48.
- Fukuda K., Kato S., Morikawa H., Shoda T. & Mori K. (1996) Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem*, **67**, 1309-1316.
- Galeffi F., Bianchi L., Bolam J.P. & Della Corte L. (2003) The effect of 6-hydroxydopamine lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. *Eur J Neurosci*, **18**, 856-868.
- Garcia L., D'Alessandro G., Bioulac B. & Hammond C. (2005) High-frequency stimulation in Parkinson's disease: more or less? *Trends Neurosci*, **28**, 209-216.
- Gaspar P., Duyckaerts C., Alvarez C., Javoy-Agid F. & Berger B. (1991) Alterations of dopaminergic and noradrenergic innervations in motor cortex in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **30**, 365-374.

- George S.R., Fan T., Xie Z., Tse R., Tam V., Varghese G. & O'Dowd B.F. (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem*, **275**, 26128-26135.
- Gerfen C.R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci*, **15**, 133-139.
- Gerfen C.R. (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci*, **23**, S64-70.
- Gerlach M. & Riederer P. (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm*, **103**, 987-1041.
- Gill S.S., Patel N.K., Hotton G.R., O'Sullivan K., McCarter R., Bunnage M., Brooks D.J., Svendsen C.N. & Heywood P. (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med*, **9**, 589-595.
- Ginsberg S.D., Martin L.J. & Rothstein J.D. (1995) Regional deafferentation down-regulates subtypes of glutamate transporter proteins. *J Neurochem*, **65**, 2800-2803.
- Giorguieff-Chesselet M.F., Besson M.J., Cheramy A. & Glowinski J. (1979) Role of various amino acids on the modulation of dopamine release from nigro-striatal dopaminergic neurones. *J. Physiol.*, **75**, 611-613.
- Glass J.D., Hauser U.E., Blank J.L., Selim M. & Rea M.A. (1993) Differential timing of amino acid and 5-HIAA rhythms in suprachiasmatic hypothalamus. *Am J Physiol*, **265**, R504-511.
- Glover V., Sandler M., Owen F. & Riley G.J. (1977) Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature*, **265**, 80-81.
- Glowinski J. & Iversen L.L. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.*, **13**, 655-669.
- Godukhin O.V., Zharikova A.D. & Budantsev A. (1984) Role of presynaptic dopamine receptors in regulation of the glutamatergic neurotransmission in rat neostriatum. *Neuroscience*, **12**, 377-383.
- Gomes I., Gupta A., Filipovska J., Szeto H.H., Pintar J.E. & Devi L.A. (2004) A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5135-5139.
- Gomez-Mancilla B. & Bedard P.J. (1993) Effect of nondopaminergic drugs on L-dopa-induced dyskinesias in MPTP-treated monkeys. *Clin Neuropharmacol*, **16**, 418-427.

-
- Gorell J.M., Johnson C.C., Rybicki B.A., Peterson E.L., Kortsha G.X., Brown G.G. & Richardson R.J. (1999) Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, **20**, 239-247.
- Grace A.A. & Bunney B.S. (1984) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci*, **4**, 2866-2876.
- Graybiel A.M. (1986) Neuropeptides in the basal ganglia. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, **64**, 135-161.
- Graybiel A.M. (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci*, **13**, 244-254.
- Greenamyre J.T., MacKenzie G., Peng T.I. & Stephans S.E. (1999) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp*, **66**, 85-97.
- Grosche J., Matyash V., Moller T., Verkhratsky A., Reichenbach A. & Kettenmann H. (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci*, **2**, 139-143.
- Groves P.M., Linder J.C. & Young S.J. (1994) 5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum. *Neuroscience*, **58**, 593-604.
- Gruetter R., Seaquist E.R. & Ugurbil K. (2001) A mathematical model of compartmentalized neurotransmitter metabolism in the human brain. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**, E100-112.
- Gubellini P., Pisani A., Centonze D., Bernardi G. & Calabresi P. (2004) Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. *Prog Neurobiol*, **74**, 271-300.
- Guigoni C., Aubert I., Li Q., Gurevich V.V., Benovic J.L., Ferry S., Mach U., Stark H., Leriche L., Hakansson K., Bioulac B.H., Gross C.E., Sokoloff P., Fisone G., Gurevich E.V., Bloch B. & Bezard E. (2005) Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: focus on D1 and D3 dopamine receptors. *Parkinsonism Relat Disord*, **11** (1), S25-29.
- Gundersen V., Danbolt N.C., Ottersen O.P. & Storm-Mathisen J. (1993) Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate. *Neuroscience*, **57**, 97-111.
- Gundersen V., Ottersen O.P. & Storm-Mathisen J. (1996) Selective excitatory amino acid uptake in glutamatergic nerve terminals and in glia in the rat striatum: quantitative electron microscopic immunocytochemistry of exogenous (D)-aspartate and endogenous glutamate and GABA. *Eur J Neurosci*, **8**, 758-765.

- Guttenberg N.D., Klop H., Minami M., Satoh M. & Voorn P. (1996) Co-localization of mu opioid receptor is greater with dynorphin than enkephalin in rat striatum. *Neuroreport*, **7**, 2119-2124.
- Haber S.N. & Watson S.J. (1985) The comparative distribution of enkephalin, dynorphin and substance P in the human globus pallidus and basal forebrain. *Neuroscience*, **14**, 1011-1024.
- Hagell P. & Widner H. (1999) Clinical rating of dyskinesias in Parkinson's disease: use and reliability of a new rating scale. *Mov Disord*, **14**, 448-455.
- Hariz M.I. & Bergenheim A.T. (2001) A 10-year follow-up review of patients who underwent Leksell's posteroventral pallidotomy for Parkinson disease. *J Neurosurg*, **94**, 552-558.
- Harris E.W. (1989) L-alpha-aminodipate antagonizes the priming effect of quisqualate in hippocampal slices. *Eur J Pharmacol*, **161**, 107-109.
- Hasegawa M., Fujiwara H., Nonaka T., Wakabayashi K., Takahashi H., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Mann D. & Iwatsubo T. (2002) Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem*, **277**, 49071-49076.
- Hashimoto A., Oka T. & Nishikawa T. (1995) Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by in vivo microdialysis. *Neuroscience*, **66**, 635-643.
- Hassel B. & Brathe A. (2000) Neuronal pyruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate. *J Neurosci*, **20**, 1342-1347.
- Hassler R., Haug P., Nitsch C., Kim J.S. & Paik K. (1982) Effect of motor and premotor cortex ablation on concentrations of amino acids, monoamines, and acetylcholine and on the ultrastructure in rat striatum. A confirmation of glutamate as the specific cortico-striatal transmitter. *J Neurochem*, **38**, 1087-1098.
- Haugstad T.S. & Langmoen I.A. (1997) L-alpha-amino adipate reduces glutamate release from brain tissue exposed to combined oxygen and glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab*, **17**, 567-570.
- He L., Fong J., von Zastrow M. & Whistler J.L. (2002) Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. *Cell*, **108**, 271-282.
- Healy D.G., Abou-Sleiman P.M., Casas J.P., Ahmadi K.R., Lynch T., Gandhi S., Muqit M.M., Foltynie T., Barker R., Bhatia K.P., Quinn N.P., Lees A.J., Gibson J.M., Holton J.L., Revesz T., Goldstein D.B. & Wood N.W. (2006) UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol*, **59**, 627-633.
- Hefti F., Melamed E. & Wurtman R.J. (1980) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res*, **195**, 123-137.

-
- Henry B. & Brotchie J.M. (1996) Potential of opioid antagonists in the treatment of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Drugs Aging*, **9**, 149-158.
- Henry B., Fox S.H., Crossman A.R. & Brotchie J.M. (2001) Mu- and delta-opioid receptor antagonists reduce levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, **171**, 139-146.
- Henry B., Duty S., Fox S.H., Crossman A.R. & Brotchie J.M. (2003) Increased striatal preproenkephalin B expression is associated with dyskinesia in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, **183**, 458-468.
- Herlitz S., Garcia D.E., Mackie K., Hille B., Scheuer T. & Catterall W.A. (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, **380**, 258-262.
- Herrera-Marschitz M., You Z.B., Goiny M., Meana J.J., Silveira R., Godukhin O.V., Chen Y., Espinoza S., Pettersson E., Loidl C.F., Lubec G., Andersson K., Nylander I., Terenius L. & Ungerstedt U. (1996) On the origin of extracellular glutamate levels monitored in the basal ganglia of the rat by in vivo microdialysis. *J Neurochem*, **66**, 1726-1735.
- Hertz L. (1979) Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog. Neurobiol.*, **13**, 277-323.
- Hertz L., Yu A.C., Kala G. & Schousboe A. (2000) Neuronal-astrocytic and cytosolic-mitochondrial metabolite trafficking during brain activation, hyperammonemia and energy deprivation. *Neurochem Int*, **37**, 83-102.
- Hertz L. (2006) Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III. *Neurochem Int*, **48**, 416-425.
- Herve D., Levi-Strauss M., Marey-Semper I., Verney C., Tassin J.P., Glowinski J. & Girault J.A. (1993) G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci*, **13**, 2237-2248.
- Hogstad S., Svenneby G., Torgner I.A., Kvamme E., Hertz L. & Schousboe A. (1988) Glutaminase in neurons and astrocytes cultured from mouse brain: kinetic properties and effects of phosphate, glutamate, and ammonia. *Neurochem Res*, **13**, 383-388.
- Hollt V. (1986) Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **26**, 59-77.
- Hornykiewicz O. & Kish S.J. (1987) Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol*, **45**, 19-34.
- Hornykiewicz O. (1998) Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology*, **51**, S2-9.

- Huang Y.H., Sinha S.R., Tanaka K., Rothstein J.D. & Bergles D.E. (2004) Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci*, **24**, 4551-4559.
- Huck S., Grass F. & Hortnagl H. (1984) The glutamate analogue alpha-aminoadipic acid is taken up by astrocytes before exerting its gliotoxic effect in vitro. *J Neurosci*, **4**, 2650-2657.
- Hudzik T.J., Howell A., Payza K. & Cross A.J. (2000) Antiparkinson potential of delta-opioid receptor agonists. *Eur J Pharmacol*, **396**, 101-107.
- Hughes J., Smith T.W., Kosterlitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A. & Morris H.R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, **258**, 577-580.
- Ikeda S.R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, **380**, 255-258.
- Ikemoto A., Bole D.G. & Ueda T. (2003) Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles. Role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem*, **278**, 5929-5940.
- Imbert C., Bezard E., Guitraud S., Boraud T. & Gross C.E. (2000) Comparison of eight clinical rating scales used for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in the Macaque monkey. *J Neurosci Methods*, **96**, 71-76.
- Imperato A. & Di Chiara G. (1984) Trans-striatal dialysis coupled to reverse phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection: a new method for the study of the in vivo release of endogenous dopamine and metabolites. *J Neurosci*, **4**, 966-977.
- Ingham C.A., Hood S.H., Taggart P. & Arbuthnott G.W. (1998) Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Neurosci*, **18**, 4732-4743.
- Iuvone P.M., Rauch A.L., Marshburn P.B., Glass D.B. & Neff N.H. (1982) Activation of retinal tyrosine hydroxylase in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase: characterization and comparison to activation in vivo by photic stimulation. *J Neurochem*, **39**, 1632-1640.
- Iwanaga K., Wakabayashi K., Yoshimoto M., Tomita I., Satoh H., Takashima H., Satoh A., Seto M., Tsujihata M. & Takahashi H. (1999) Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy body diseases. *Neurology*, **52**, 1269-1271.
- Jenner P. (2000) Factors influencing the onset and persistence of dyskinesia in MPTP-treated primates. *Ann Neurol*, **47**, S90-99; discussion S99-104.

-
- Jeong S.W. & Ikeda S.R. (1998) G protein alpha subunit G alpha z couples neurotransmitter receptors to ion channels in sympathetic neurons. *Neuron*, **21**, 1201-1212.
- Jhamandas K. & Marien M. (1987) Glutamate-evoked release of endogenous brain dopamine: inhibition by an excitatory amino acid antagonist and an enkephalin analogue. *Br J Pharmacol*, **90**, 641-650.
- Jiang Z.G. & North R.A. (1992) Pre- and postsynaptic inhibition by opioids in rat striatum. *J Neurosci*, **12**, 356-361.
- Jimenez-Castellanos J. & Graybiel A.M. (1987) Subdivisions of the dopamine-containing A8-A9-A10 complex identified by their differential mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix. *Neuroscience*, **23**, 223-242.
- Jin X.T. & Smith Y. (2007) Activation of presynaptic kainate receptors suppresses GABAergic synaptic transmission in the rat globus pallidus. *Neuroscience*.
- Jitrapakdee S., Vidal-Puig A. & Wallace J.C. (2006) Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 843-854.
- Johansson P.A., Andersson M., Andersson K.E. & Cenci M.A. (2001) Alterations in cortical and basal ganglia levels of opioid receptor binding in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis*, **8**, 220-239.
- Jones D.G. & Harris R.J. (1995) An analysis of contemporary morphological concepts of synaptic remodelling in the CNS: perforated synapses revisited. *Rev Neurosci*, **6**, 177-219.
- Jonkers N., Sarre S., Ebinger G. & Michotte Y. (2002) MK801 suppresses the L-DOPA-induced increase of glutamate in striatum of hemi-Parkinson rats. *Brain Res*, **926**, 149-155.
- Jordan B.A. & Devi L.A. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, **399**, 697-700.
- Jordan B.A., Trapaidze N., Gomes I., Nivarthi R. & Devi L.A. (2001) Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 343-348.
- Jose X., Pineda J.C., Rodriguez C., Mendoza E., Galarraga E., Bargas J. & Barral J. (2007) Delta opioids reduce the neurotransmitter release probability by enhancing transient (KV4) K⁺-currents in corticostriatal synapses as evaluated by the paired pulse protocol. *Neurosci Lett*, **414**, 150-154.
- Jutkiewicz E.M. (2006) The antidepressant-like effects of delta-opioid receptor agonists. *Mol Interv*, **6**, 162-169.
- Kam K. & Nicoll R. (2007) Excitatory synaptic transmission persists independently of the glutamate-glutamine cycle. *J Neurosci*, **27**, 9192-9200.

- Kanai Y. & Hediger M.A. (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch*, **447**, 469-479.
- Kase H., Aoyama S., Ichimura M., Ikeda K., Ishii A., Kanda T., Koga K., Koike N., Kurokawa M., Kuwana Y., Mori A., Nakamura J., Nonaka H., Ochi M., Saki M., Shimada J., Shindou T., Shiozaki S., Suzuki F., Takeda M., Yanagawa K., Richardson P.J., Jenner P., Bedard P., Borrelli E., Hauser R.A. & Chase T.N. (2003) Progress in pursuit of therapeutic A2A antagonists: the adenosine A2A receptor selective antagonist KW6002: research and development toward a novel nondopaminergic therapy for Parkinson's disease. *Neurology*, **61**, S97-100.
- Kato S., Ishita S., Sugawara K. & Mawatari K. (1993) Cystine/glutamate antiporter expression in retinal Muller glial cells: implications for DL-alpha-aminoadipate toxicity. *Neuroscience*, **57**, 473-482.
- Kato S., Mawatari K., Sugitani K. & Yasui Y. (1996) DL- α -aminoadipate is a toxin to Müller cells. *Prog. Retin. Eye Res.*, **15**, 435-454.
- Kawaguchi Y. (1997) Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res*, **27**, 1-8.
- Kebabian J.W. & Calne D.B. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature*, **277**, 93-96.
- Keefe K.A., Zigmond M.J. & Abercrombie E.D. (1993) In vivo regulation of extracellular dopamine in the neostriatum: influence of impulse activity and local excitatory amino acids. *J Neural Transm Gen Sect*, **91**, 223-240.
- Kemel M.L., Desban M., Glowinski J. & Gauchy C. (1989) Distinct presynaptic control of dopamine release in striosomal and matrix areas of the cat caudate nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9006-9010.
- Kemp J.M. & Powell T.P. (1971) The termination of fibres from the cerebral cortex and thalamus upon dendritic spines in the caudate nucleus: a study with the Golgi method. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **262**, 429-439.
- Kempster P.A., Gibb W.R., Stern G.M. & Lees A.J. (1989) Asymmetry of substantia nigra neuronal loss in Parkinson's disease and its relevance to the mechanism of levodopa related motor fluctuations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **52**, 72-76.
- Kew J.N. & Kemp J.A. (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, **179**, 4-29.
- Khandhar S.M. & Marks W.J. (2007) Epidemiology of Parkinson's disease. *Dis Mon*, **53**, 200-205.

-
- Khurgel M., Koo A.C. & Ivy G.O. (1996) Selective ablation of astrocytes by intracerebral injections of α -aminoadipate. *Glia*, **16**, 351-358.
- Kincaid A.E., Zheng T. & Wilson C.J. (1998) Connectivity and convergence of single corticostriatal axons. *J Neurosci*, **18**, 4722-4731.
- Kirik D., Georgievska B. & Bjorklund A. (2004) Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci*, **7**, 105-110.
- Kish S.J., Shannak K. & Hornykiewicz O. (1988) Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med*, **318**, 876-880.
- Klein C. & Schlossmacher M.G. (2007) Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution. Multiple clues to a complex disorder. *Neurology*, **69**, 2093-104.
- Koch H.P., Kavanaugh M.P., Esslinger C.S., Zerangue N., Humphrey J.M., Amara S.G., Chamberlin A.R. & Bridges R.J. (1999) Differentiation of substrate and nonsubstrate inhibitors of the high-affinity, sodium-dependent glutamate transporters. *Mol Pharmacol*, **56**, 1095-1104.
- Kramer T.H., Davis P., Hruby V.J., Burks T.F. & Porreca F. (1993) In vitro potency, affinity and agonist efficacy of highly selective delta opioid receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther*, **266**, 577-584.
- Kubo S., Hattori N. & Mizuno Y. (2006) Recessive Parkinson's disease. *Mov Disord*, **21**, 885-893.
- Kubota Y., Inagaki S. & Kito S. (1986) Innervation of substance P neurons by catecholaminergic terminals in the neostriatum. *Brain Res*, **375**, 163-167.
- Kubota Y., Inagaki S., Kito S., Takagi H. & Smith A.D. (1986) Ultrastructural evidence of dopaminergic input to enkephalinergic neurons in rat neostriatum. *Brain Res*, **367**, 374-378.
- Kuoppamaki M., Al-Barghouthy G., Jackson M., Smith L., Zeng B.Y., Quinn N. & Jenner P. (2002) Beginning-of-dose and rebound worsening in MPTP-treated common marmosets treated with levodopa. *Mov Disord*, **17**, 1312-1317.
- Kuppenbender K.D., Standaert D.G., Feuerstein T.J., Penney J.B., Jr., Young A.B. & Landwehrmeyer G.B. (2000) Expression of NMDA receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the human striatum. *J Comp Neurol*, **419**, 407-421.
- Kvamme E., Svenneby G., Hertz L. & Schousboe A. (1982) Properties of phosphate activated glutaminase in astrocytes cultured from mouse brain. *Neurochem Res*, **7**, 761-770.

- Laake J.H., Takumi Y., Eidet J., Torgner I.A., Roberg B., Kvamme E. & Ottersen O.P. (1999) Postembedding immunogold labelling reveals subcellular localization and pathway-specific enrichment of phosphate activated glutaminase in rat cerebellum. *Neuroscience*, **88**, 1137-1151.
- Lai B.C., Marion S.A., Teschke K. & Tsui J.K. (2002) Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, **8**, 297-309.
- Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W. & Irwin I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, **219**, 979-980.
- Langston J.W., Quik M., Petzinger G., Jakowec M. & Di Monte D.A. (2000) Investigating levodopa-induced dyskinesias in the parkinsonian primate. *Ann Neurol*, **47**, S79-89.
- Lauriat T.L., Richler E. & McInnes L.A. (2007) A quantitative regional expression profile of EAAT2 known and novel splice variants reopens the question of aberrant EAAT2 splicing in disease. *Neurochem Int*, **50**, 271-280.
- Lawrence A.J. & Jarrott B. (1994) L-glutamate as a neurotransmitter at baroreceptor afferents: evidence from in vivo microdialysis. *Neuroscience*, **58**, 585-591.
- Le Moine C., Kieffer B., Gaveriaux-Ruff C., Befort K. & Bloch B. (1994) Delta-opioid receptor gene expression in the mouse forebrain: localization in cholinergic neurons of the striatum. *Neuroscience*, **62**, 635-640.
- Lebon V., Petersen K.F., Cline G.W., Shen J., Mason G.F., Dufour S., Behar K.L., Shulman G.I. & Rothman D.L. (2002) Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J Neurosci*, **22**, 1523-1531.
- Lee T., Seeman P., Rajput A., Farley I.J. & Hornykiewicz O. (1978) Receptor basis for dopaminergic supersensitivity in Parkinson's disease. *Nature*, **273**, 59-61.
- Lee C.S., Cenci M.A., Schulzer M. & Bjorklund A. (2000) Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain*, **123** (7), 1365-1379.
- Leffler C.W., Parfenova H., Fedinec A.L., Basuroy S. & Tcheranova D. (2006) Contributions of astrocytes and CO to pial arteriolar dilation to glutamate in newborn pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **291**, H2897-2904.
- Lehre K.P., Levy L.M., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J. & Danbolt N.C. (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci*, **15**, 1835-1853.

-
- Lei W., Jiao Y., Del Mar N. & Reiner A. (2004) Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *J Neurosci*, **24**, 8289-8299.
- Lerma J. (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 481-495.
- Leviel V. (2001) The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem Int*, **38**, 83-106.
- Levy L.M., Lehre K.P., Walaas S.I., Storm-Mathisen J. & Danbolt N.C. (1995) Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur J Neurosci*, **7**, 2036-2041.
- Levy R., Dostrovsky J.O., Lang A.E., Sime E., Hutchison W.D. & Lozano A.M. (2001) Effects of apomorphine on subthalamic nucleus and globus pallidus internus neurons in patients with Parkinson's disease. *J Neurophysiol*, **86**, 249-260.
- Lewis R.V., Stern A.S., Kimura S., Stein S. & Udenfriend S. (1980) Enkephalin biosynthetic pathway: proteins of 8000 and 14,000 daltons in bovine adrenal medulla. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**, 5018-5020.
- Li L.Y. & Chang K.J. (1996) The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol*, **50**, 599-602.
- Li J.L., Fujiyama F., Kaneko T. & Mizuno N. (2003) Expression of vesicular glutamate transporters, VGluT1 and VGluT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. *J Comp Neurol*, **457**, 236-249.
- Lieth E., LaNoue K.F., Berkich D.A., Xu B., Ratz M., Taylor C. & Hutson S.M. (2001) Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. *J Neurochem*, **76**, 1712-1723.
- Lievens J.C., Salin P., Had-Aissouni L., Mahy N. & Kerkerian-Le Goff L. (2000) Differential effects of corticostriatal and thalamostriatal deafferentation on expression of the glutamate transporter GLT1 in the rat striatum. *J Neurochem*, **74**, 909-919.
- Lightman S.L., Ninkovic M., Hunt S.P. & Iversen L.L. (1983) Evidence for opiate receptors on pituicytes. *Nature*, **305**, 235-237.
- Lin L.F., Doherty D.H., Lile J.D., Bektesh S. & Collins F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, **260**, 1130-1132.
- Lindberg I. & Dahl J.L. (1981) Characterization of enkephalin release from rat striatum. *J Neurochem*, **36**, 506-512.

- Lindfors N. & Ungerstedt U. (1990) Bilateral regulation of glutamate tissue and extracellular levels in caudate-putamen by midbrain dopamine neurons. *Neurosci Lett*, **115**, 248-252.
- Lindgren H.S., Rylander D., Ohlin K.E., Lundblad M. & Cenci M.A. (2007) The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. *Behav Brain Res*, **177**, 150-159.
- Lindner M.D., Plone M.A., Francis J.M. & Emerich D.F. (1996) Validation of a rodent model of Parkinson's Disease: evidence of a therapeutic window for oral Sinemet. *Brain Res Bull*, **39**, 367-372.
- Linser J.P. & Moscona A.A. (1981) Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: its suppression by the gliatoxic agent alpha-aminoadipic acid. *Brain Res.*, **227**, 103-119.
- Liu Y., Peter D., Roghani A., Schuldiner S., Prive G.G., Eisenberg D., Brecha N. & Edwards R.H. (1992) A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell*, **70**, 539-551.
- Liu X., Ford-Dunn H.L., Hayward G.N., Nandi D., Miall R.C., Aziz T.Z. & Stein J.F. (2002) The oscillatory activity in the Parkinsonian subthalamic nucleus investigated using the macro-electrodes for deep brain stimulation. *Clin Neurophysiol*, **113**, 1667-1672.
- Liu Q.S., Xu Q., Arcuino G., Kang J. & Nedergaard M. (2004) Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3172-3177.
- Logothetis D.E., Kurachi Y., Galper J., Neer E.J. & Clapham D.E. (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature*, **325**, 321-326.
- Longoni R., Spina L., Mulas A., Carboni E., Garau L., Melchiorri P. & Di Chiara G. (1991) (D-Ala²)deltorphin II: D1-dependent stereotypies and stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, **11**, 1565-1576.
- Lonnroth P., Jansson P.A. & Smith U. (1987) A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am J Physiol*, **253**, E228-231.
- Lou L.G. & Pei G. (1997) Modulation of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase by delta-opioid. *Biochem Biophys Res Commun*, **236**, 626-629.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lubetzki C., Chesselet M.F. & Glowinski J. (1982) Modulation of dopamine release in rat striatal slices by delta opiate agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, **222**, 435-440.

-
- Lundblad M., Andersson M., Winkler C., Kirik D., Wierup N. & Cenci M.A. (2002) Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, **15**, 120-132.
- Lynch D.R. & Guttman R.P. (2002) Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, **300**, 717-723.
- MacDonald J.F., Xiong Z.G. & Jackson M.F. (2006) Paradox of Ca²⁺ signaling, cell death and stroke. *Trends Neurosci*, **29**, 75-81.
- Malarkey E.B. & Parpura V. (2007) Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int.* (doi:10.1016/j.neuint.2007.06.005).
- Malfroy B., Swerts J.P., Guyon A., Roques B.P. & Schwartz J.C. (1978) High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature*, **276**, 523-526.
- Mannaioni G., Marino M.J., Valenti O., Traynelis S.F. & Conn P.J. (2001) Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci*, **21**, 5925-5934.
- Manning-Bog A.B., McCormack A.L., Purisai M.G., Bolin L.M. & Di Monte D.A. (2003) Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci*, **23**, 3095-3099.
- Mansour A., Fox C.A., Burke S., Meng F., Thompson R.C., Akil H. & Watson S.J. (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, **350**, 412-438.
- Mansour A., Hoversten M.T., Taylor L.P., Watson S.J. & Akil H. (1995) The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Res*, **700**, 89-98.
- Mao L. & Wang J.Q. (2003) Group I metabotropic glutamate receptor-mediated calcium signalling and immediate early gene expression in cultured rat striatal neurons. *Eur J Neurosci*, **17**, 741-750.
- Marcotte E.R., Sullivan R.M. & Mishra R.K. (1994) Striatal G-proteins: effects of unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Neurosci Lett*, **169**, 195-198.
- Marin C., Papa S., Engber T.M., Bonastre M., Tolosa E. & Chase T.N. (1996) MK-801 prevents levodopa-induced motor response alterations in parkinsonian rats. *Brain Res*, **736**, 202-205.
- Marsden C.A. (2006) Dopamine: the rewarding years. *Br J Pharmacol*, **147** (1), S136-144.
- Martignoni E., Riboldazzi G., Calandrella D. & Riva N. (2003) Motor complications of Parkinson's disease. *Neurol Sci*, **24** (1), S27-29.

- Martinez J.L., Jr., Weinberger S.B. & Schulteis G. (1988) Enkephalins and learning and memory: a review of evidence for a site of action outside the blood-brain barrier. *Behav Neural Biol*, **49**, 192-221.
- Matsas R., Kenny J. & Turner A. (1985) Endopeptidase-24.11 'enkephalinase': its role in the central nervous system. *Prog Clin Biol Res*, **180**, 273-277.
- Matsumoto R.R., Brinsfield K.H., Patrick R.L. & Walker J.M. (1988) Rotational behavior mediated by dopaminergic and nondopaminergic mechanisms after intranigral microinjection of specific mu, delta and kappa opioid agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, **246**, 196-203.
- Matsumoto M., Yoshioka M., Togashi H., Hirokami M., Tochihara M., Ikeda T., Smith C.B. & Saito H. (1994) mu-Opioid receptors modulate noradrenaline release from the rat hippocampus as measured by brain microdialysis. *Brain Res*, **636**, 1-8.
- Matute C., Alberdi E., Domercq M., Sanchez-Gomez M.V., Perez-Samartin A., Rodriguez-Antiguedad A. & Perez-Cerda F. (2007) Excitotoxic damage to white matter. *J Anat*, **210**, 693-702.
- Maura G., Giardi A. & Raiteri M. (1988) Release-regulating D-2 dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther*, **247**, 680-684.
- Mc Bean G.J. (1990) Intrastratial injection of DL- α -amino adipate reduces kainate toxicity in vitro. *Neuroscience*, **34**, 225-234.
- Mc Bean G.J. (1994) Inhibition of the glutamate transporter and glial enzymes in rat striatum by the gliotoxin, α -amino adipate. *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 536-540.
- McBain C.J. & Mayer M.L. (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev*, **74**, 723-760.
- McGeorge A.J. & Faull R.L. (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, **29**, 503-537.
- Meldrum B.S. (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, **130**, 1007S-1015S.
- Meredith G.E., Farrell T., Kellaghan P., Tan Y., Zahm D.S. & Totterdell S. (1999) Immunocytochemical characterization of catecholaminergic neurons in the rat striatum following dopamine-depleting lesions. *Eur J Neurosci*, **11**, 3585-3596.
- Meshul C.K., Emre N., Nakamura C.M., Allen C., Donohue M.K. & Buckman J.F. (1999) Time-dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience*, **88**, 1-16.

-
- Meshul C.K., Cogen J.P., Cheng H.W., Moore C., Krentz L. & McNeill T.H. (2000) Alterations in rat striatal glutamate synapses following a lesion of the cortico- and/or nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, **165**, 191-206.
- Metman L.V., van den Munckhof P., Klaassen A.A., Blanchet P., Mouradian M.M. & Chase T.N. (1997) Effects of supra-threshold levodopa doses on dyskinesias in advanced Parkinson's disease. *Neurology*, **49**, 711-713.
- Meucci E., Delay-Goyet P., Roques B.P. & Zajac J.M. (1989) Binding in vivo of selective mu and delta opioid receptor agonists: opioid receptor occupancy by endogenous enkephalins. *Eur J Pharmacol*, **171**, 167-178.
- Meyer M.E., McLaurin B.I. & Meyer M.E. (1995) Intra-accumbens delta 1-opioid agonist, pC1-DPDPE, differentially affects patterns of locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav*, **51**, 359-362.
- Michael A.C., Justice J.B., Jr. & Neill D.B. (1985) In vivo voltammetric determination of the kinetics of dopamine metabolism in the rat. *Neurosci Lett*, **56**, 365-369.
- Miller R. & Beninger R.J. (1991) On the interpretation of asymmetries of posture and locomotion produced with dopamine agonists in animals with unilateral depletion of striatal dopamine. *Prog Neurobiol*, **36**, 229-256.
- Mink J.W. (1996) The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol*, **50**, 381-425.
- Miyamae T., Fukushima N., Misu Y. & Ueda H. (1993) Delta opioid receptor mediates phospholipase C activation via Gi in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett*, **333**, 311-314.
- Moghaddam B., Gruen R.J., Roth R.H., Bunney B.S. & Adams R.N. (1990) Effect of L-glutamate on the release of striatal dopamine: in vivo dialysis and electrochemical studies. *Brain Res*, **518**, 55-60.
- Moghaddam B. (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem*, **60**, 1650-1657.
- Molchanova S., Koobi P., Oja S.S. & Saransaari P. (2004) Interstitial concentrations of amino acids in the rat striatum during global forebrain ischemia and potassium-evoked spreading depression. *Neurochem Res*, **29**, 1519-1527.
- Montana V., Malarkey E.B., Verderio C., Matteoli M. & Parpura V. (2006) Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia*, **54**, 700-715.
- Montiel T., Camacho A., Estrada-Sanchez A.M. & Massieu L. (2005) Differential effects of the substrate inhibitor l-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) and the non-substrate inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) of glutamate transporters on

- neuronal damage and extracellular amino acid levels in rat brain in vivo. *Neuroscience*, **133**, 667-678.
- Moore D.J., Zhang L., Troncoso J., Lee M.K., Hattori N., Mizuno Y., Dawson T.M. & Dawson V.L. (2005) Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet*, **14**, 71-84.
- Morari M., O'Connor W.T., Ungerstedt U. & Fuxe K. (1993) N-methyl-D-aspartic acid differentially regulates extracellular dopamine, GABA, and glutamate levels in the dorsolateral neostriatum of the halothane-anesthetized rat: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem*, **60**, 1884-1893.
- Morissette M., Goulet M., Calon F., Falardeau P., Blanchet P.J., Bedard P.J. & Di Paolo T. (1996) Changes of D1 and D2 dopamine receptor mRNA in the brains of monkeys lesioned with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: correction with chronic administration of L-3,4-dihydroxyphenylalanine. *Mol Pharmacol*, **50**, 1073-1079.
- Mosberg H.I., Hurst R., Hruby V.J., Gee K., Yamamura H.I., Galligan J.J. & Burks T.F. (1983) Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 5871-5874.
- Mulder A.H., Wardeh G., Hogenboom F. & Frankhuyzen A.L. (1984) Kappa- and delta-opioid receptor agonists differentially inhibit striatal dopamine and acetylcholine release. *Nature*, **308**, 278-280.
- Nagatsu T., Levitt M. & Udenfriend S. (1964) Tyrosine Hydroxylase. the Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem*, **239**, 2910-2917.
- Naito S. & Ueda T. (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem*, **44**, 99-109.
- Nakamura Y., Iga K., Shibata T., Shudo M. & Kataoka K. (1993) Glial plasmalemmal vesicles: a subcellular fraction from rat hippocampal homogenate distinct from synaptosomes. *Glia*, **9**, 48-56.
- Nakamura M., Jang I.S., Ishibashi H., Watanabe S. & Akaike N. (2003a) Possible roles of kainate receptors on GABAergic nerve terminals projecting to rat substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurophysiol*, **90**, 1662-1670.
- Nakamura Y., Ohmaki M., Murakami K. & Yoneda Y. (2003b) Involvement of protein kinase C in glutamate release from cultured microglia. *Brain Res*, **962**, 122-128.
- Napieralski J.A., Butler A.K. & Chesselet M.F. (1996) Anatomical and functional evidence for lesion-specific sprouting of corticostriatal input in the adult rat. *J Comp Neurol*, **373**, 484-497.

-
- Narita M., Mizoguchi H., Kampine J.P. & Tseng L.F. (1996) Role of protein kinase C in desensitization of spinal delta-opioid-mediated antinociception in the mouse. *Br J Pharmacol*, **118**, 1829-1835.
- Nash J.F. & Yamamoto B.K. (1993) Effect of D-amphetamine on the extracellular concentrations of glutamate and dopamine in iprindole-treated rats. *Brain Res*, **627**, 1-8.
- Naudon L., Leroux-Nicollet I., Raisman-Vozari R., Botton D. & Costentin J. (1995) Time-course of modifications elicited by reserpine on the density and mRNA synthesis of the vesicular monoamine transporter, and on the density of the membrane dopamine uptake complex. *Synapse*, **21**, 29-36.
- Negri L., Noviello L. & Noviello V. (1996) Antinociceptive and behavioral effects of synthetic deltorphin analogs. *Eur J Pharmacol*, **296**, 9-16.
- Nieoullon A., Cheramy A. & Glowinski J. (1978) Release of dopamine evoked by electrical stimulation of the motor and visual areas of the cerebral cortex in both caudate nuclei and in the substantia nigra in the cat. *Brain Res*, **145**, 69-83.
- Nirenberg M.J., Vaughan R.A., Uhl G.R., Kuhar M.J. & Pickel V.M. (1996) The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci*, **16**, 436-447.
- Nishimura R.N., Santos D., Fu S.T. & Dwyer B.E. (2000) Induction of cell death by L-alpha-amino adipic acid exposure in cultured rat astrocytes: relationship to protein synthesis. *Neurotoxicology*, **21**, 313-320.
- Norenberg M.D. & Martinez-Hernandez A. (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res*, **161**, 303-310.
- Nutt J.G. (1990) Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations. *Neurology*, **40**, 340-345.
- Nutt J.G., Burchiel K.J., Comella C.L., Jankovic J., Lang A.E., Laws E.R., Jr., Lozano A.M., Penn R.D., Simpson R.K., Jr., Stacy M. & Wooten G.F. (2003) Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology*, **60**, 69-73.
- Oh J.D., Russell D.S., Vaughan C.L. & Chase T.N. (1998) Enhanced tyrosine phosphorylation of striatal NMDA receptor subunits: effect of dopaminergic denervation and L-DOPA administration. *Brain Res*, **813**, 150-159.
- Olanow C.W. (2000) Tolcapone and hepatotoxic effects. Tasmar Advisory Panel. *Arch Neurol*, **57**, 263-267.
- Olanow C.W., Goetz C.G., Kordower J.H., Stoessl A.J., Sossi V., Brin M.F., Shannon K.M., Nauert G.M., Perl D.P., Godbold J. & Freeman T.B. (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **54**, 403-414.

- Oldenziel W.H., Dijkstra G., Cremers T.I. & Westerink B.H. (2006) In vivo monitoring of extracellular glutamate in the brain with a microsensor. *Brain Res*, **1118**, 34-42.
- Olianas M.C. & Onali P. (1995) Participation of delta opioid receptor subtypes in the stimulation of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**, 1560-1567.
- Olney J.W., Ho O.L. & Rhee V. (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res*, **14**, 61-76.
- Olney J.W., Degubareff T. & Collins J.F. (1980) Stereospecificity of the gliotoxic anti-neurotoxic actions of alpha-aminoadipate. *Neurosci. Lett.*, **19**, 278-282.
- Olney J.W. (1990) Excitotoxicity: an overview. *Can Dis Wkly Rep*, **16** (1E), 47-57; discussion 57-48.
- Ostermeier A.M., Schlosser B., Schwender D. & Sutor B. (2000) Activation of mu- and delta-opioid receptors causes presynaptic inhibition of glutamatergic excitation in neocortical neurons. *Anesthesiology*, **93**, 1053-1063.
- Ottersen O.P., Zhang N. & Walberg F. (1992) Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience*, **46**, 519-534.
- Ottersen O.P., Takumi Y., Matsubara A., Landsend A.S., Laake J.H. & Usami S. (1998) Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Prog Neurobiol*, **54**, 127-148.
- Ozelius L.J., Senthil G., Saunders-Pullman R., Ohmann E., Deligtisch A., Tagliati M., Hunt A.L., Klein C., Henick B., Hailpern S.M., Lipton R.B., Soto-Valencia J., Risch N. & Bressman S.B. (2006) LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, **354**, 424-425.
- Ozkan E.D. & Ueda T. (1998) Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. *Jpn J Pharmacol*, **77**, 1-10.
- Pahwa R., Factor S.A., Lyons K.E., Ondo W.G., Gronseth G., Bronte-Stewart H., Hallett M., Miyasaki J., Stevens J. & Weiner W.J. (2006) Practice Parameter: treatment of Parkinson disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, **66**, 983-995.
- Pallone J.A. (2007) Introduction to Parkinson's disease. *Dis Mon*, **53**, 195-199.
- Palucha A. & Pilc A. (2007) Metabotropic glutamate receptor ligands as possible anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacol Ther*, **115**, 116-147.

-
- Pannicke T., Stabel J., Heinemann U. & Reichelt W. (1994) alpha-Aminoadipic acid blocks the Na(+)-dependent glutamate transport into acutely isolated Müller glial cell from guinea pig retina. *Pflugers Arch.*, **429**, 140-142.
- Papa S.M., Boldry R.C., Engber T.M., Kask A.M. & Chase T.N. (1995) Reversal of levodopa-induced motor fluctuations in experimental parkinsonism by NMDA receptor blockade. *Brain Res*, **701**, 13-18.
- Papa S.M. & Chase T.N. (1996) Levodopa-induced dyskinesias improved by a glutamate antagonist in Parkinsonian monkeys. *Ann Neurol*, **39**, 574-578.
- Papa S.M., Desimone R., Fiorani M. & Oldfield E.H. (1999) Internal globus pallidus discharge is nearly suppressed during levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol*, **46**, 732-738.
- Parent A. (1990) Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci*, **13**, 254-258.
- Parent A. & Hazrati L.N. (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev*, **20**, 91-127.
- Parent A. & Hazrati L.N. (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev*, **20**, 128-154.
- Parent A. & Cicchetti F. (1998) The current model of basal ganglia organization under scrutiny. *Mov Disord*, **13**, 199-202.
- Parpura V., Basarsky T.A., Liu F., Jeftinija K., Jeftinija S. & Haydon P.G. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, **369**, 744-747.
- Pasinetti G.M., Kohama S., Reinhard J.F., Jr., Cheng H.W., McNeill T.H. & Finch C.E. (1991) Striatal responses to decortication. I. Dopaminergic and astrocytic activities. *Brain Res*, **567**, 253-259.
- Pasternak G.W. (2001) Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sci*, **68**, 2213-2219.
- Paulsen R.E. & Fonnum F. (1989) Role of glial cells for the basal and Ca²⁺-dependent K⁺-evoked release of transmitter amino acids investigated by microdialysis. *J Neurochem*, **52**, 1823-1829.
- Paxinos G. & Watson C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Ed. 2*. Academic Press, New York.
- Pedersen O.O. & Karlsen R.L. (1979) Destruction of Muller cells in the adult rat by intravitreal injection of D,L-alpha-aminoadipic acid. An electron microscopic study. *Exp Eye Res*, **28**, 569-575.

- Pentney R.J. & Gratton A. (1991) Effects of local delta and mu opioid receptor activation on basal and stimulated dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rat: an in vivo electrochemical study. *Neuroscience*, **45**, 95-102.
- Perlow M.J., Freed W.J., Hoffer B.J., Seiger A., Olson L. & Wyatt R.J. (1979) Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*, **204**, 643-647.
- Pert C.B. & Snyder S.H. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*, **179**, 1011-1014.
- Petit F., Hamon M., Fournie-Zaluski M.C., Roques B.P. & Glowinski J. (1986) Further evidence for a role of delta-opiate receptors in the presynaptic regulation of newly synthesized dopamine release. *Eur J Pharmacol*, **126**, 1-9.
- Pfrieger F.W. & Barres B.A. (1996) New views on synapse-glia interactions. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 615-621.
- Piani D. & Fontana A. (1994) Involvement of the cystine transport system xc- in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J Immunol*, **152**, 3578-3585.
- Piccini P., Weeks R.A. & Brooks D.J. (1997) Alterations in opioid receptor binding in Parkinson's disease patients with levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol*, **42**, 720-726.
- Picconi B., Centonze D., Hakansson K., Bernardi G., Greengard P., Fisone G., Cenci M.A. & Calabresi P. (2003) Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Neurosci*, **6**, 501-506.
- Pickel V.M., Sumal K.K., Beckley S.C., Miller R.J. & Reis D.J. (1980) Immunocytochemical localization of enkephalin in the neostriatum of rat brain: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, **189**, 721-740.
- Pin J.P. & Duvoisin R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, **34**, 1-26.
- Pisani A., Gubellini P., Bonsi P., Conquet F., Picconi B., Centonze D., Bernardi G. & Calabresi P. (2001) Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons. *Neuroscience*, **106**, 579-587.
- Pollak P., Benabid A.L., Gross C., Gao D.M., Laurent A., Benazzouz A., Hoffmann D., Gentil M. & Perret J. (1993) [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. *Rev Neurol (Paris)*, **149**, 175-176.

-
- Polymeropoulos M.H., Higgins J.J., Golbe L.I., Johnson W.G., Ide S.E., Di Iorio G., Sanges G., Stenroos E.S., Pho L.T., Schaffer A.A., Lazzarini A.M., Nussbaum R.L. & Duvoisin R.C. (1996) Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*, **274**, 1197-1199.
- Portoghese P.S., Sultana M. & Takemori A.E. (1988) Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide delta opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, **146**, 185-186.
- Pow D.V. (2001) Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to aminoadipic acid, a selectively transported substrate. *Glia*, **34**, 27-38.
- Przedborski S., Levivier M., Jiang H., Ferreira M., Jackson-Lewis V., Donaldson D. & Togasaki D.M. (1995) Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, **67**, 631-647.
- Quock R.M., Burkey T.H., Varga E., Hosohata Y., Hosohata K., Cowell S.M., Slate C.A., Ehler F.J., Roeske W.R. & Yamamura H.I. (1999) The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacol Rev*, **51**, 503-532.
- Rae C., Hare N., Bubb W.A., McEwan S.R., Broer A., McQuillan J.A., Balcar V.J., Conigrave A.D. & Broer S. (2003) Inhibition of glutamine transport depletes glutamate and GABA neurotransmitter pools: further evidence for metabolic compartmentation. *J Neurochem*, **85**, 503-514.
- Rajput A.H., Rajput A., Lang A.E., Kumar R., Uitti R.J. & Galvez-Jimenez N. (1998) New use for an old drug: amantadine benefits levodopa-induced dyskinesia. *Mov Disord*, **13**, 851.
- Rascol O., Brooks D.J., Korczyn A.D., De Deyn P.P., Clarke C.E. & Lang A.E. (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N Engl J Med*, **342**, 1484-1491.
- Rawls S.M. & McGinty J.F. (1997) L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid-evoked striatal glutamate levels are attenuated by calcium reduction, tetrodotoxin, and glutamate receptor blockade. *J Neurochem*, **68**, 1553-1563.
- Rawls S.M. & McGinty J.F. (2000) Delta opioid receptors regulate calcium-dependent, amphetamine-evoked glutamate levels in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*, **861**, 296-304.
- Raynor K., Kong H., Chen Y., Yasuda K., Yu L., Bell G.I. & Reisine T. (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol*, **45**, 330-334.

- Reavill C., Jenner P. & Marsden C.D. (1983) Differentiation of dopamine agonists using drug-induced rotation in rats with unilateral or bilateral 6-hydroxydopamine destruction of ascending dopamine pathways. *Biochem Pharmacol*, **32**, 865-870.
- Reid M.S., Hsu K., Jr. & Berger S.P. (1997) Cocaine and amphetamine preferentially stimulate glutamate release in the limbic system: studies on the involvement of dopamine. *Synapse*, **27**, 95-105.
- Reid S.N. & Farber D.B. (2005) Glial transcytosis of a photoreceptor-secreted signaling protein, retinoschisin. *Glia*, **49**, 397-406.
- Reimer R.J., Fremeau R.T., Jr., Bellocchio E.E. & Edwards R.H. (2001) The essence of excitation. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 417-421.
- Reiner A., Medina L. & Haber S.N. (1999) The distribution of dynorphinergic terminals in striatal target regions in comparison to the distribution of substance P-containing and enkephalinergic terminals in monkeys and humans. *Neuroscience*, **88**, 775-793.
- Reisine T. (1995) Opiate receptors. *Neuropharmacology*, **34**, 463-472.
- Rezak M. (2007) Current pharmacotherapeutic treatment options in Parkinson's disease. *Dis Mon*, **53**, 214-222.
- Robelet S., Melon C., Guillet B., Salin P. & Kerkerian-Le Goff L. (2004) Chronic L-DOPA treatment increases extracellular glutamate levels and GLT1 expression in the basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, **20**, 1255-1266.
- Robinson T.E. & Justice J.B. (1991) *Microdialysis in the Neurosciences*, Elsevier, Amsterdam.
- Robinson M.B. & Dowd L.A. (1997) Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Adv Pharmacol*, **37**, 69-115.
- Rochet J.C., Outeiro T.F., Conway K.A., Ding T.T., Volles M.J., Lashuel H.A., Bieganski R.M., Lindquist S.L. & Lansbury P.T. (2004) Interactions among alpha-synuclein, dopamine, and biomembranes: some clues for understanding neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*, **23**, 23-34.
- Rodriguez M. & Gonzalez-Hernandez T. (1999) Electrophysiological and morphological evidence for a GABAergic nigrostriatal pathway. *J Neurosci*, **19**, 4682-4694.
- Rogawski M.A., Gryder D., Castaneda D., Yonekawa W., Banks M.K. & Lia H. (2003) GluR5 kainate receptors, seizures, and the amygdala. *Ann N Y Acad Sci*, **985**, 150-162.

-
- Roques B.P., Fournie-Zaluski M.C., Soroca E., Lecomte J.M., Malfroy B., Llorens C. & Schwartz J.C. (1980) The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature*, **288**, 286-288.
- Roques B.P., Gacel G., Dauge V., Baamonde A., Calenco G., Turcaud S., Coric P. & Fournie-Zaluski M.C. (1990) Novel approaches in the development of new analgesics. *Neurophysiol Clin*, **20**, 369-387.
- Roques B.P., Noble F., Dauge V., Fournie-Zaluski M.C. & Beaumont A. (1993) Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev*, **45**, 87-146.
- Rosales M.G., Martinez-Fong D., Morales R., Nunez A., Flores G., Gongora-Alfaro J.L., Floran B. & Aceves J. (1997) Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study. *Neuroscience*, **80**, 803-810.
- Rothman D.L., Behar K.L., Hyder F. & Shulman R.G. (2003) In vivo NMR studies of the glutamate neurotransmitter flux and neuroenergetics: implications for brain function. *Annu Rev Physiol*, **65**, 401-427.
- Rothstein J.D. & Tabakoff B. (1984) Alteration of striatal glutamate release after glutamine synthetase inhibition. *J Neurochem*, **43**, 1438-1446.
- Rothstein J.D., Martin L., Levey A.I., Dykes-Hoberg M., Jin L., Wu D., Nash N. & Kuncl R.W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, **13**, 713-725.
- Rowe W.B., Ronzio R.A., Wellner V.P. & Meister A. (1970) Glutamine Synthetase (Sheep Brain). *Methods Enzymol*, **17**, 900-910.
- Ruzicka B.B., Fox C.A., Thompson R.C., Meng F., Watson S.J. & Akil H. (1995) Primary astroglial cultures derived from several rat brain regions differentially express mu, delta and kappa opioid receptor mRNA. *Brain Res Mol Brain Res*, **34**, 209-220.
- Sandberg M., Ward H.K. & Bradford H.F. (1985) Effect of cortico-striate pathway lesion on the activities of enzymes involved in synthesis and metabolism of amino acid neurotransmitters in the striatum. *J Neurochem*, **44**, 42-47.
- Savitt J.M., Dawson V.L. & Dawson T.M. (2007) Parkinson Disease: Molecular Insights. In Waxman, S.G. (ed.) *Molecular Neurology*. Elsevier Academic Press, Burlington, pp. 221-239.
- Scatton B., Worms P., Lloyd K.G. & Bartholini G. (1982) Cortical modulation of striatal function. *Brain Res*, **232**, 331-343.
- Scatton B., Javoy-Agid F., Rouquier L., Dubois B. & Agid Y. (1983) Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res*, **275**, 321-328.

- Schad C.A., Justice J.B.J. & Holtzman S.G. (1996) Differential effects of delta- and mu-opioid receptor antagonists on the amphetamine-induced increase in extracellular dopamine in striatum and nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, **67**, 2292-2299.
- Schallert T., De Ryck M., Whishaw I.Q., Ramirez V.D. & Teitelbaum P. (1979) Excessive bracing reactions and their control by atropine and L-DOPA in an animal analog of Parkinsonism. *Exp Neurol*, **64**, 33-43.
- Schallert T. & Tillerson J.L. (2000) *Central Nervous System Diseases: Innovative Models of CNS Diseases from Molecule to Therapy*. Humana, Totowa, New Jersey.
- Schmitt A., Asan E., Lesch K.P. & Kugler P. (2002) A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience*, **109**, 45-61.
- Schmitz D., Mellor J. & Nicoll R.A. (2001) Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science*, **291**, 1972-1976.
- Schoepp D.D. (2001) Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*, **299**, 12-20.
- Schoffeleer A.N., Rice K.C., Jacobson A.E., Van Gelderen J.G., Hogenboom F., Heijna M.H. & Mulder A.H. (1988) Mu-, delta- and kappa-opioid receptor-mediated inhibition of neurotransmitter release and adenylate cyclase activity in rat brain slices: studies with fentanyl isothiocyanate. *Eur J Pharmacol*, **154**, 169-178.
- Schousboe A., Svenneby G. & Hertz L. (1977) Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. *J Neurochem*, **29**, 999-1005.
- Schrag A. & Quinn N. (2000) Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain*, **123** (11), 2297-2305.
- Schwartz R.K. & Huston J.P. (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol*, **50**, 275-331.
- Segovia G. & Mora F. (1998) Role of nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. *Brain Res Bull*, **45**, 275-279.
- Sesack S.R., Aoki C. & Pickel V.M. (1994) Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J Neurosci*, **14**, 88-106.
- Sgambato-Faure V., Buggia V., Gilbert F., Levesque D., Benabid A.L. & Berger F. (2005) Coordinated and spatial upregulation of arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats. *J Neuropathol Exp Neurol*, **64**, 936-947.

-
- Shammah-Lagnado S.J., Alheid G.F. & Heimer L. (1996) Efferent connections of the caudal part of the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol*, **376**, 489-507.
- Shen J., Petersen K.F., Behar K.L., Brown P., Nixon T.W., Mason G.F., Petroff O.A., Shulman G.I., Shulman R.G. & Rothman D.L. (1999) Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8235-8240.
- Shigemoto R., Kulik A., Roberts J.D., Ohishi H., Nusser Z., Kaneko T. & Somogyi P. (1996) Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature*, **381**, 523-525.
- Shigeri Y., Seal R.P. & Shimamoto K. (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev*, **45**, 250-265.
- Sibson N.R., Mason G.F., Shen J., Cline G.W., Herskovits A.Z., Wall J.E., Behar K.L., Rothman D.L. & Shulman R.G. (2001) In vivo (¹³C) NMR measurement of neurotransmitter glutamate cycling, anaplerosis and TCA cycle flux in rat brain during. *J Neurochem*, **76**, 975-989.
- Siegfried J. & Lippitz B. (1994) Bilateral chronic electrostimulation of ventroposterolateral pallidum: a new therapeutic approach for alleviating all parkinsonian symptoms. *Neurosurgery*, **35**, 1126-1129; discussion 1129-1130.
- Silkis I. (2000) The cortico-basal ganglia-thalamocortical circuit with synaptic plasticity. I. Modification rules for excitatory and inhibitory synapses in the striatum. *Biosystems*, **57**, 187-196.
- Silvestri L., Caputo V., Bellacchio E., Atorino L., Dallapiccola B., Valente E.M. & Casari G. (2005) Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet*, **14**, 3477-3492.
- Simantov R. & Snyder S.H. (1976) Morphine-like peptides in mammalian brain: isolation, structure elucidation, and interactions with the opiate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 2515-2519.
- Simon E.J., Hiller J.M. & Edelman I. (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 1947-1949.
- Slezak M. & Pfrieder F.W. (2003) New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci*, **26**, 531-535.
- Smith A.D. & Bolam J.P. (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci*, **13**, 259-265.

- Smith J.A., Leslie F.M., Broide R.S. & Loughlin S.E. (1993) Long-term changes in striatal opioid systems after 6-hydroxydopamine lesion of rat substantia nigra. *Neuroscience*, **55**, 935-951.
- Smith Y., Bevan M.D., Shink E. & Bolam J.P. (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*, **86**, 353-387.
- Smith Y. & Kieval J.Z. (2000) Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci*, **23**, S28-33.
- Smith Y., Raju D.V., Pare J.F. & Sidibe M. (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci*, **27**, 520-527.
- Smolders I., Sarre S., Vanhaesendonck C., Ebinger G. & Michotte Y. (1996) Extracellular striatal dopamine and glutamate after decortication and kainate receptor stimulation, as measured by microdialysis. *J Neurochem*, **66**, 2373-2380.
- Spanagel R., Herz A. & Shippenberg T.S. (1990) The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem*, **55**, 1734-1740.
- Spector S., Gordon R., Sjoerdsma A. & Udenfriend S. (1967) End-product inhibition of tyrosine hydroxylase as a possible mechanism for regulation of norepinephrine synthesis. *Mol Pharmacol*, **3**, 549-555.
- Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Hasegawa M. & Goedert M. (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6469-6473.
- Spina L., Longoni R., Mulas A., Chang K.J. & Di Chiara G. (1998) Dopamine-dependent behavioural stimulation by non-peptide delta opioids BW373U86 and SNC 80: 1. Locomotion, rearing and stereotypies in intact rats. *Behav Pharmacol*, **9**, 1-8.
- Spooren W., Ballard T., Gasparini F., Amalric M., Mutel V. & Schreiber R. (2003) Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders. *Behav Pharmacol*, **14**, 257-277.
- Standaert D.G., Friberg I.K., Landwehrmeyer G.B., Young A.B. & Penney J.B., Jr. (1999) Expression of NMDA glutamate receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the striatum of the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, **64**, 11-23.
- Starr M.S. (1995) Glutamate/dopamine D1/D2 balance in the basal ganglia and its relevance to Parkinson's disease. *Synapse*, **19**, 264-293.

-
- Stefani A., Chen Q., Flores-Hernandez J., Jiao Y., Reiner A. & Surmeier D.J. (1998) Physiological and molecular properties of AMPA/Kainate receptors expressed by striatal medium spiny neurons. *Dev Neurosci*, **20**, 242-252.
- Steiner H. & Gerfen C.R. (1998) Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. *Exp Brain Res*, **123**, 60-76.
- Stephens B., Mueller A.J., Shering A.F., Hood S.H., Taggart P., Arbuthnott G.W., Bell J.E., Kilford L., Kingsbury A.E., Daniel S.E. & Ingham C.A. (2005) Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience*, **132**, 741-754.
- Sullivan R., Rauen T., Fischer F., Wiessner M., Grewer C., Bicho A. & Pow D.V. (2004) Cloning, transport properties, and differential localization of two splice variants of GLT-1 in the rat CNS: implications for CNS glutamate homeostasis. *Glia*, **45**, 155-169.
- Sun F., Kanthasamy A., Anantharam V. & Kanthasamy A.G. (2007) Environmental neurotoxic chemicals-induced ubiquitin proteasome system dysfunction in the pathogenesis and progression of Parkinson's disease. *Pharmacol Ther*, **114**, 327-344.
- Sundstrom E. & Samuelsson E.B. (1997) Comparison of key steps in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in rodents. *Pharmacol Toxicol*, **81**, 226-231.
- Surmeier D.J., Ding J., Day M., Wang Z. & Shen W. (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*, **30**, 228-235.
- Szatkowski M., Barbour B. & Attwell D. (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*, **348**, 443-446.
- Szele F.G., Alexander C. & Chesselet M.F. (1995) Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *J Neurosci*, **15**, 4429-4448.
- Szerb J.C. & O'Regan P.A. (1985) Effect of glutamine on glutamate release from hippocampal slices induced by high K⁺ or by electrical stimulation: interaction with different Ca²⁺ concentrations. *J Neurochem*, **44**, 1724-1731.
- Takada M. & Hattori T. (1986) Fine structural changes in the rat brain after local injections of gliotoxin, alpha-aminoadipic acid. *Histol Histopathol*, **1**, 271-275.
- Takamori S., Rhee J.S., Rosenmund C. & Jahn R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, **407**, 189-194.
- Takamori S. (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res*, **55**, 343-351.

- Tanaka Y., Nijijima K., Mizuno Y. & Yoshida M. (1986) Changes in gamma-aminobutyrate, glutamate, aspartate, glycine, and taurine contents in the striatum after unilateral nigrostriatal lesions in rats. *Exp Neurol*, **91**, 259-268.
- Tang T., Kiang J.G., Cote T. & Cox B.M. (1995) Opioid-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in ND8-47 neuroblastoma x dorsal root ganglion hybrid cells is mediated through G protein-coupled delta-opioid receptors and desensitized by chronic exposure to opioid. *J Neurochem*, **65**, 1612-1621.
- Tang B., Xiong H., Sun P., Zhang Y., Wang D., Hu Z., Zhu Z., Ma H., Pan Q., Xia J.H., Xia K. & Zhang Z. (2006) Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, **15**, 1816-1825.
- Tanner C.M. (1996) Early intervention in Parkinson's disease: epidemiologic considerations. *Ann Epidemiol*, **6**, 438-441.
- Tanner C.M. & Aston D.A. (2000) Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. *Curr Opin Neurol*, **13**, 427-430.
- Tapiero H., Mathe G., Couvreur P. & Tew K.D. (2002) II. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother*, **56**, 446-457.
- Taylor M.D., De Ceballos M.L., Rose S., Jenner P. & Marsden C.D. (1992) Effects of a unilateral 6-hydroxydopamine lesion and prolonged L-3,4-dihydroxyphenylalanine treatment on peptidergic systems in rat basal ganglia. *Eur J Pharmacol*, **219**, 183-192.
- Terenius L. (1973) Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, **33**, 377-384.
- Thobois S., Delamarre-Damier F. & Derkinderen P. (2005) Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview. *Clin Neurol Neurosurg*, **107**, 269-281.
- Thorlin T., Eriksson P.S., Persson P.A.I., Aberg N.D., Hansson E. & Rönnbäck L. (1998) Delta-opioid receptors on astroglial cells primary culture: mobilization of intracellular free calcium via a pertussis sensitive G protein. *Neuropharmacol.*, **37**, 299-311.
- Timmerman W. & Westerink B.H. (1997) Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse*, **27**, 242-261.
- Tossman U., Segovia J. & Ungerstedt U. (1986) Extracellular levels of amino acids in striatum and globus pallidus of 6-hydroxydopamine-lesioned rats measured with microdialysis. *Acta Physiol Scand*, **127**, 547-551.
- Trovero F., Herve D., Desban M., Glowinski J. & Tassin J.P. (1990) Striatal opiate mu-receptors are not located on dopamine nerve endings in the rat. *Neuroscience*, **39**, 313-321.

-
- Tsai M.J., Chang Y.F., Schwarcz R. & Brookes N. (1996) Characterization of L-alpha-amino adipic acid transport in cultured rat astrocytes. *Brain Res.*, **741**, 166-173.
- Tsu R.C., Chan J.S. & Wong Y.H. (1995) Regulation of multiple effectors by the cloned delta-opioid receptor: stimulation of phospholipase C and type II adenylyl cyclase. *J Neurochem*, **64**, 2700-2707.
- Turner A.J. & Tanzawa K. (1997) Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *Faseb J*, **11**, 355-364.
- Tzschentke T.M. (2002) Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications -- an introduction. *Amino Acids*, **23**, 147-152.
- Ueda M., Sugimoto K., Oyama T., Kuraishi Y. & Satoh M. (1995) Opioidergic inhibition of capsaicin-evoked release of glutamate from rat spinal dorsal horn slices. *Neuropharmacology*, **34**, 303-308.
- Ulas J., Weihmuller F.B., Brunner L.C., Joyce J.N., Marshall J.F. & Cotman C.W. (1994) Selective increase of NMDA-sensitive glutamate binding in the striatum of Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and mixed Parkinson's disease/Alzheimer's disease patients: an autoradiographic study. *J Neurosci*, **14**, 6317-6324.
- Ullian E.M., Sapperstein S.K., Christopherson K.S. & Barres B.A. (2001) Control of synapse number by glia. *Science*, **291**, 657-661.
- Ungerstedt U. & Arbuthnott G.W. (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*, **24**, 485-493.
- Ungerstedt U. (1971a) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl*, **367**, 69-93.
- Ungerstedt U. (1971b) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl*, **367**, 95-122.
- Ungerstedt U. (1976) 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: the turning syndrome. *Pharmacol Ther [B]*, **2**, 37-40.
- Ungerstedt U. (1984) Measurement of neurotransmitter release by intracranial microdialysis, in *Measurement of Neurotransmitter Release In Vivo* (Marsden C.A., ed.) 81-105. John Wiley & Sons, Chichester.
- Valastro B., Dekundy A., Krogh M., Lundblad M., James P., Danysz W., Quack G. & Cenci M.A. (2007) Proteomic analysis of striatal proteins in the rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem*, **102**, 1395-1409.

- Valenti O., Marino M.J., Wittmann M., Lis E., DiLella A.G., Kinney G.G. & Conn P.J. (2003) Group III metabotropic glutamate receptor-mediated modulation of the striatopallidal synapse. *J Neurosci*, **23**, 7218-7226.
- Vallar L. & Meldolesi J. (1989) Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *Trends Pharmacol Sci*, **10**, 74-77.
- Vallone D., Pellecchia M.T., Morelli M., Verde P., DiChiara G. & Barone P. (1997) Behavioural sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats is related to compositional changes of the AP-1 transcription factor: evidence for induction of FosB- and JunD-related proteins. *Brain Res Mol Brain Res*, **52**, 307-317.
- van der Berg C. & Garfinkel D. (1971) A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem J*, **123**, 211-218.
- Varoqui H., Schafer M.K., Zhu H., Weihe E. & Erickson J.D. (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci*, **22**, 142-155.
- Verhagen Metman L., Del Dotto P., Natta R., van den Munckhof P. & Chase T.N. (1998) Dextromethorphan improves levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Neurology*, **51**, 203-206.
- Vessal M., Dugani C.B., Solomon D.A., McIntyre Burnham W. & Ivy G.O. (2005) Might astrocytes play a role in maintaining the seizure-prone state? *Brain Res*, **1044**, 190-196.
- Vlaskovska M., Schramm M., Nylander I., Kasakov L., You Z.B., Herrera-Marschitz M. & Terenius L. (1997) Opioid effects on 45Ca²⁺ uptake and glutamate release in rat cerebral cortex in primary culture. *J Neurochem*, **68**, 517-524.
- Volterra A. & Meldolesi J. (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 626-640.
- Vuillet J., Kerkerian L., Kachidian P., Bosler O. & Nieoullon A. (1989) Ultrastructural correlates of functional relationships between nigral dopaminergic or cortical afferent fibers and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett*, **100**, 99-104.
- Waagepetersen H.S., Qu H., Schousboe A. & Sonnewald U. (2001) Elucidation of the quantitative significance of pyruvate carboxylation in cultured cerebellar neurons and astrocytes. *J Neurosci Res*, **66**, 763-770.
- Waagepetersen H.S., Qu H., Sonnewald U., Shimamoto K. & Schousboe A. (2005) Role of glutamine and neuronal glutamate uptake in glutamate homeostasis and synthesis during vesicular release in cultured glutamatergic neurons. *Neurochem Int*, **47**, 92-102.

-
- Waddell A.B. & Holtzman S.G. (1998) Modulation of cocaine-induced motor activity in the rat by opioid receptor agonists. *Behav Pharmacol*, **9**, 397-407.
- Waksman G., Hamel E., Delay-Goyet P. & Roques B.P. (1987) Neutral endopeptidase-24.11, mu and delta opioid receptors after selective brain lesions: an autoradiographic study. *Brain Res*, **436**, 205-216.
- Waldhoer M., Bartlett S.E. & Whistler J.L. (2004) Opioid receptors. *Annu Rev Biochem*, **73**, 953-990.
- Walter B.L. & Vitek J.L. (2004) Surgical treatment for Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, **3**, 719-728.
- Walter B.L., Abosch A. & Vitek J.L. (2005) Current Neurosurgical Treatments for Parkinson's Disease: Where Did They Come From? In Waxman, S.G. (ed.) *From Neuroscience to Neurology*. Elsevier Academic Press, Burlington, pp. 159-174.
- Wang J.K. (1991) Presynaptic glutamate receptors modulate dopamine release from striatal synaptosomes. *J Neurochem*, **57**, 819-822.
- Warenycia M.W., McKenzie G.M., Murphy M. & Szerb J.C. (1987) The effects of cortical ablation on multiple unit activity in the striatum following dexamphetamine. *Neuropharmacology*, **26**, 1107-1114.
- Warr O., Takahashi M. & Attwell D. (1999) Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *J Physiol*, **514** (3), 783-793.
- Wellner V.P., Zoukis M. & Meister A. (1966) Activity of glutamine synthetase toward the optical isomers of alpha-amino adipic acid. *Biochemistry*, **5**, 3509-3514.
- Werling L.L., Frattali A., Portoghese P.S., Takemori A.E. & Cox B.M. (1988) Kappa receptor regulation of dopamine release from striatum and cortex of rats and guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther*, **246**, 282-286.
- Westerink B.H. & Spaan S.J. (1982) Estimation of the turnover of 3-methoxytyramine in the rat striatum by HPLC with electrochemical detection: implications for the sequence in the cerebral metabolism of dopamine. *J Neurochem*, **38**, 342-347.
- Westerink B.H., Damsma G., Rollema H., De Vries J.B. & Horn A.S. (1987a) Scope and limitations of in vivo brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. *Life Sci*, **41**, 1763-1776.
- Westerink B.H., Tuntler J., Damsma G., Rollema H. & de Vries J.B. (1987a) The use of tetrodotoxin for the characterization of drug-enhanced dopamine release in conscious rats studied by brain dialysis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **336**, 502-507.

- Westerink B.H., Damsma G. & de Vries J.B. (1989a) Effect of ouabain applied by intrastriatal microdialysis on the in vivo release of dopamine, acetylcholine, and amino acids in the brain of conscious rats. *J Neurochem*, **52**, 705-712.
- Westerink B.H., Hofsteede R.M., Tuntler J. & de Vries J.B. (1989b) Use of calcium antagonism for the characterization of drug-evoked dopamine release from the brain of conscious rats determined by microdialysis. *J Neurochem*, **52**, 722-729.
- Westin J.E., Andersson M., Lundblad M. & Cenci M.A. (2001) Persistent changes in striatal gene expression induced by long-term L-DOPA treatment in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, **14**, 1171-1176.
- Wightman R.M. & Zimmerman J.B. (1990) Control of dopamine extracellular concentration in rat striatum by impulse flow and uptake. *Brain Res Brain Res Rev*, **15**, 135-144.
- Winkler C., Kirik D., Bjorklund A. & Cenci M.A. (2002) L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis*, **10**, 165-186.
- Wolters E.C. & Francot C.M.J.E. (1998) Mental dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, **9**, s83-89.
- Wu Y., Richard S. & Parent A. (2000) The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci Res*, **38**, 49-62.
- Wuster M. & Herz A. (1978) Opiate agonist action of antidiarrheal agents in vitro and in vivo--findings in support for selective action. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **301**, 187-194.
- Xu M., Moratalla R., Gold L.H., Hiroi N., Koob G.F., Graybiel A.M. & Tonegawa S. (1994) Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. *Cell*, **79**, 729-742.
- Yaksh T.L. (1997) Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand*, **41**, 94-111.
- Yamamoto B.K. & Davy S. (1992) Dopaminergic modulation of glutamate release in striatum as measured by microdialysis. *J Neurochem*, **58**, 1736-1742.
- Yao H.H., Ding J.H., Zhou F., Wang F., Hu L.F., Sun T. & Hu G. (2005) Enhancement of glutamate uptake mediates the neuroprotection exerted by activating group II or III metabotropic glutamate receptors on astrocytes. *J Neurochem*, **92**, 948-961.
- You Z.B., Herrera-Marschitz M., Nylander I., Goigny M., O'Connor W.T., Ungerstedt U. & Terenius L. (1994) The striatonigral dynorphin pathway of the rat studied with in vivo

-
- microdialysis - II. Effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists. *Neuroscience*, **63**, 427-434.
- Young A.M. & Bradford H.F. (1986) Excitatory amino acid neurotransmitters in the corticostriate pathway: studies using intracerebral microdialysis in vivo. *J Neurochem*, **47**, 1399-1404.
- Yu A.C., Drejer J., Hertz L. & Schousboe A. (1983) Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J Neurochem*, **41**, 1484-1487.
- Yung K.K., Bolam J.P., Smith A.D., Hersch S.M., Ciliax B.J. & Levey A.I. (1995) Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience*, **65**, 709-730.
- Yung K.K., Smith A.D., Levey A.I. & Bolam J.P. (1996) Synaptic connections between spiny neurons of the direct and indirect pathways in the neostriatum of the rat: evidence from dopamine receptor and neuropeptide immunostaining. *Eur J Neurosci*, **8**, 861-869.
- Zerangue N. & Kavanaugh M.P. (1996) Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*, **383**, 634-637.
- Zetterstrom T., Sharp T., Marsden C.A. & Ungerstedt U. (1983) In vivo measurement of dopamine and its metabolites by intracerebral dialysis: changes after d-amphetamine. *J Neurochem*, **41**, 1769-1773.
- Zetterstrom T. & Ungerstedt U. (1984) Effects of apomorphine on the in vivo release of dopamine and its metabolites, studied by brain dialysis. *Eur J Pharmacol*, **97**, 29-36.
- Zetterstrom T., Sharp T., Collin A.K. & Ungerstedt U. (1988) In vivo measurement of extracellular dopamine and DOPAC in rat striatum after various dopamine-releasing drugs; implications for the origin of extracellular DOPAC. *Eur J Pharmacol*, **148**, 327-334.
- Zheng G., Dwoskin L.P. & Crooks P.A. (2006) Vesicular monoamine transporter 2: role as a novel target for drug development. *Aaps J*, **8**, E682-692.
- Zhuang Z.Y., Wen Y.R., Zhang D.R., Borsello T., Bonny C., Strichartz G.R., Decosterd I. & Ji R.R. (2006) A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci*, **26**, 3551-3560.
- Zoli M. & Agnati L.F. (1996) Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses. *Prog Neurobiol*, **49**, 363-380.

ANNEXES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1 : Mise en évidence de la compartimentalisation du striatum à partir d'une coupe coronale de cerveau humain réalisée au niveau striatal et traitée par marquage de l'enzyme acétylcholine estérase.</i>	<i>34</i>
<i>Figure 2 : Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles des neurones striataux.....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 3 : Organisation anatomo-fonctionnelle des projections cortico-striatales chez le Rat.</i>	<i>41</i>
<i>Figure 4 : Organisation anatomo-fonctionnelle des projections nigro-striatales chez le Rat.</i>	<i>43</i>
<i>Figure 5 : Organisation anatomo-fonctionnelle des projections striatales efférentes chez le Rat.</i>	<i>47</i>
<i>Figure 6 : Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base.</i>	<i>52</i>
<i>Figure 7 : Représentation schématique des principales voies glutamatergiques centrales chez le Rat.</i>	<i>57</i>
<i>Figure 8 : Voies de biosynthèse et de recyclage du glutamate.</i>	<i>59</i>
<i>Figure 9 : Représentation schématique des différents mécanismes de libération de glutamate à partir des cellules gliales.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 10 : Représentation schématique de la transmission du signal glutamatergique et des systèmes de recapture du glutamate.</i>	<i>65</i>
<i>Figure 11 : Les récepteurs glutamatergiques.</i>	<i>67</i>
<i>Figure 12 : Représentation schématique des principales voies dopaminergiques centrales chez le Rat.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 13 : Biosynthèse et métabolisme de la dopamine.</i>	<i>79</i>
<i>Figure 14 : Représentation schématique du métabolisme de la dopamine et de sa libération au niveau d'une terminaison dopaminergique chez le Rat.</i>	<i>82</i>
<i>Figure 15 : Représentation schématique de la distribution cérébrale des neurones enképhalinergiques chez le Rat.....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 16 : Biosynthèse et structure des enképhalines.</i>	<i>91</i>
<i>Figure 17 : Principaux agonistes et antagonistes des récepteurs opioïdes de type δ.</i>	<i>98</i>
<i>Figure 18 : Principales caractéristiques anatomiques et motrices de la maladie de Parkinson.</i>	<i>101</i>
<i>Figure 19 : Les corps de Lewy.....</i>	<i>107</i>
<i>Figure 20 : Hypothèse d'évènements génétiques et environnementaux multiples dans l'étiologie de la maladie de Parkinson.</i>	<i>114</i>
<i>Figure 21 : Représentation schématique du modèle anatomo-fonctionnel classique dans le contexte de la maladie de Parkinson.....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 22 : Représentation schématique du modèle anatomo-fonctionnel alternatif.</i>	<i>131</i>
<i>Figure 23 : Représentation schématique des mécanismes d'actions du MPTP et de la 6-OHDA.....</i>	<i>135</i>

<i>Figure 24 : Microdialyse intracérébrale chez l'animal éveillé.....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 25 : Réaction de dérivatisation des acides aminés grâce à l'o-phthaldialdéhyde en présence d'un groupement thiol.....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 26 : Réaction de dosage de l'activité glutamine synthétase.....</i>	<i>162</i>
<i>Figure 27 : Représentation chronologique des différentes interventions effectuées au cours du protocole des dyskinésies induites par la L-DOPA.....</i>	<i>167</i>
<i>Figure 28 : Mouvements involontaires et anormaux exprimés par le rat hémiparkinsonien traité par la L-DOPA.....</i>	<i>169</i>
<i>Figure 29 : Évaluation sur des coupes striatales colorées au crésyl violet de l'étendue de la lésion produite par thermo-coagulation du cortex.....</i>	<i>179</i>
<i>Figure 30 : Évolution de la capture synaptosomale de glutamate dans le striatum après lésion du cortex ipsilatéral.....</i>	<i>182</i>
<i>Figure 31 : Effet de la TTX et d'une déplétion en calcium sur les concentrations de dopamine mesurées dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux témoins.....</i>	<i>190</i>
<i>Figure 32 : Effet de la TTX et d'une déplétion en calcium sur les concentrations de glutamate mesurées dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux témoins.....</i>	<i>192</i>
<i>Figure 33 : Effet de la DPDPE sur les concentrations de dopamine mesurées dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis ou non à une thermo-coagulation du cortex.....</i>	<i>196</i>
<i>Figure 34 : Effet de la DPDPE sur les concentrations de glutamate mesurées dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis ou non à une thermo-coagulation du cortex ipsilatéral.....</i>	<i>201</i>
<i>Figure 35 : Effet du naltrindole sur les concentrations de glutamate mesurées dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux témoins soumis ou non à une infusion de DPDPE.....</i>	<i>202</i>
<i>Figure 36 : Caractérisation de la radiolisation de [³H]-DPDPE à des préparations synaptosomales obtenues à partir du striatum.....</i>	<i>205</i>
<i>Figure 37 : Effet de la DPDPE et du L-αAA sur les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum.....</i>	<i>219</i>
<i>Figure 38 : Effet de la DPDPE et du L-αAA sur les concentrations de dopamine dans les dialysats collectés à partir du striatum.....</i>	<i>222</i>
<i>Figure 39 : Effet de la DPDPE sur les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis ou non, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L-αAA.....</i>	<i>228</i>
<i>Figure 40 : Effet de la glutamine sur les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum chez des animaux soumis, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L-αAA.....</i>	<i>233</i>

Figure 41 : Effet de la DPDPE, en présence de glutamine, sur les concentrations de glutamate dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L- α AA. 234

Figure 42 : Effet de la DPDPE sur les concentrations de dopamine dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis ou non, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L- α AA. 237

Figure 43 : Effet de la glutamine sur les concentrations de dopamine dans les dialysats collectés à partir du striatum chez des animaux soumis, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L- α AA. 239

Figure 44 : Effet de la DPDPE, en présence de glutamine, sur les concentrations de dopamine dans les dialysats collectés à partir du striatum d'animaux soumis, deux jours plus tôt, à une injection intra-striatale de L- α AA. 241

Figure 45 : Effet de l'acide L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylique (PDC) sur la libération de glutamate induite par la DPDPE et effet de la DPDPE sur la capture synaptosomale de glutamate. 244

Figure 46 : Corrélations entre différents index comportementaux et neurochimiques 2 semaines après l'injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale. 253

Figure 47 : Évolution en fonction du temps des mouvements involontaires anormaux induits par la L-DOPA chez des animaux hémi-parkinsoniens. 262

Figure 48 : Évaluation des concentrations tissulaires de dopamine dans le striatum d'animaux ayant subi, 5 semaines plus tôt, une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale et soumis ou non au traitement par la L-DOPA. 266

Figure 49 : Évaluation des concentrations tissulaires de glutamate dans le striatum d'animaux ayant subi, 5 semaines plus tôt, une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale et soumis ou non au traitement par la L-DOPA. 268

Figure 50 : Effets de la DPDPE et du naltrindole sur les mouvements involontaires anormaux induits par la L-DOPA chez des animaux hémi-parkinsoniens. 273

Figure 51 : Évaluation de la liaison de [3 H]-DPDPE à des membranes striatales d'animaux ayant subi 5 semaines plus tôt une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale et soumis ou non au traitement chronique par la L-DOPA. 276

Figure 52 : Évaluation des concentrations tissulaires de dopamine dans le striatum d'animaux ayant subi, 5 semaines plus tôt, une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale et soumis ou non à une lésion du cortex ipsilatéral. 281

Figure 53 : Évaluation des concentrations tissulaires de glutamate dans le striatum d'animaux ayant subi, 5 semaines plus tôt, une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale et soumis ou non à une lésion du cortex ipsilatéral. 283

Figure 54 : Effets de la DPDPE sur les mouvements involontaires anormaux induits par la L-DOPA chez des animaux hémi-parkinsoniens dyskinétiques soumis ou non à une lésion du cortex ipsilatéral. 285

Figure 55 : Évaluation de la liaison de [3 H]-DPDPE chez des animaux ayant subi 5 semaines plus tôt une injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale, traités à la L-DOPA et soumis ou non à une lésion du cortex ipsilatéral. 287

<i>Table 1 : Principaux types de neurones striataux.</i>	36
<i>Table 2 : Principales caractéristiques pharmacologiques des récepteurs glutamatergiques.</i>	69
<i>Table 3 : Principaux agonistes et antagonistes des récepteurs dopaminergiques.</i>	87
<i>Table 4 : Sélectivité de diverses substances opioïdes à l'égard des récepteurs opioïdes de type μ, δ et κ.</i>	95
<i>Table 5 : Distribution des récepteurs opioïdes de type δ dans le cerveau de Rat.</i>	96
<i>Table 6 : Les différents symptômes de la maladie de Parkinson.</i>	104
<i>Table 7 : Facteurs monogéniques impliqués dans la maladie de Parkinson.</i>	109
<i>Table 8 : Récapitulatif des principales caractéristiques des techniques chirurgicales utilisées dans le traitement de la maladie de Parkinson.</i>	122
<i>Table 9 : Modifications neurochimiques induites dans le striatum deux jours après la lésion du cortex ipsilatéral.</i>	181
<i>Table 10 : Modifications neurochimiques induites dans le striatum deux heures après l'infusion intra-striatale de L-αAA.</i>	216
<i>Table 11 : Modifications neurochimiques induites dans le striatum deux jours après l'injection intra-striatale de L-αAA.</i>	225

Involvement of corticostriatal glutamatergic terminals in striatal dopamine release elicited by stimulation of δ -opioid receptors

Fabrice Billet, Nathalie Dourmap and Jean Costentin

Unité de Neuropsychopharmacologie Expérimentale, U.M.R. 6036 C.N.R.S., I.F.R.M.P. no. 23, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rouen, 22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cédex 01, France

Keywords: dopamine release, glutamate release, microdialysis, δ -opioid receptor, rat, striatum

Abstract

We have previously shown that striatal dopamine release induced locally by a δ -opioid receptor agonist was totally inhibited by a glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, indicating the involvement of glutamatergic receptors in this effect. The aim of the present study was to specify this mechanism. Firstly, we investigated the effect of [D-Pen²,D-Pen⁵]-enkephalin (DPDPE) on glutamate release in rats by intrastriatal microdialysis. The infusion of DPDPE (10 μ M) enhanced the glutamate content in dialysate by approximately 34%, an effect which did not appear to result from inhibition of glutamate uptake. We then considered the consequences of a unilateral thermocoagulation of the frontal cortex on either glutamate or dopamine release induced by stimulation of δ -opioid receptors 2 days later. This lesion, which decreased the glutamate content in ipsilateral striatum by approximately 30%, totally prevented the increase in dialysate levels of glutamate induced by DPDPE. Moreover, whereas DPDPE (10 μ M) was found to increase the striatal dopamine release in intact animals by approximately 59%, this effect was also completely suppressed by the cortical lesion. Finally, we studied the effect of the lesion on the [³H]-DPDPE binding to striatal membranes prepared from the whole striatum. In the ipsilateral striatum a significant decrease in this [³H]-DPDPE binding (by approximately 18%) was found 2 days after the lesion. Our results indicate that the increase in striatal dopamine release induced by DPDPE probably depends on glutamate release from corticostriatal glutamatergic afferents in response to the stimulation of δ -opioid receptors located on terminals of these neurons.

Introduction

The striatum receives large projections from cerebral cortex and substantia nigra (pars compacta) which, respectively, use glutamate and dopamine as neurotransmitters. Furthermore, it contains numerous neuropeptides among which enkephalins, the preferential endogenous ligands of δ -opioid receptors, are the most abundant.

Although no direct synaptic contact between nigrostriatal and corticostriatal terminals has been observed in the striatum, glutamate is able to stimulate dopamine release (Giorguieff-Chesselet *et al.*, 1979; Westerink *et al.*, 1989; Wang, 1991) whereas dopamine, in contrast, inhibits glutamate release (for review, see Morari *et al.*, 1998). As regards δ -opioid receptors, several studies have reported that their stimulation increases the striatal release of dopamine (Chesselet *et al.*, 1981; Dourmap *et al.*, 1990; Spanagel *et al.*, 1990). In addition, we previously reported that this effect was totally prevented by the glutamate *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist 3-(\pm)-2-carboxypiperazine-4-yl]-propionyl-1-phosphonate (Dourmap & Costentin, 1994). This observation suggests an indirect effect of enkephalins on striatal dopaminergic neurons via corticostriatal glutamatergic terminals. However, our understanding of the effects induced by the stimulation of δ -opioid receptors on striatal glutamate release remains limited. Americ *et al.* (1986) reported that Met-enkephalin increased

glutamate release from striatal slices but Met-enkephalin is not selective for δ -opioid receptors as it also binds to μ -opioid receptors (Meucci *et al.*, 1989), although with a weaker affinity (Mansour *et al.*, 1995). More recently, Rawls & McGinty (2000) suggested an involvement of δ -opioid receptors in the amphetamine-induced glutamate release as it was decreased by naltrindole, a δ -opioid receptor antagonist. However, this amphetamine effect on glutamate release remains controversial because it has not been observed in other studies (Nash & Yamamoto, 1993; Reid *et al.*, 1997). As regards the striatal localization of δ -opioid receptors, various autoradiographic studies have shown that these receptors and their mRNA are predominantly expressed by cholinergic interneurons (Le Moine *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1994). However, we observed that striatal dopamine release elicited by local injection of the δ -opioid receptor agonist [D-Pen²,D-Pen⁵]-enkephalin (DPDPE) persisted in spite of the striatal lesion produced by kainic acid (Dourmap *et al.*, 1992), which argued in favour of the location on striatal axon terminals of δ -opioid receptors involved in this effect. This hypothesis was recently confirmed by the study of Wang & Pickel (2001) showing that some striatal δ -opioid receptors are also expressed in dopamine-containing terminals and in terminals forming asymmetric axospinous synapses (putative corticostriatal afferents).

The aim of the present study was to investigate whether terminals of corticostriatal glutamatergic neurons are endowed with δ -opioid receptors, whose stimulation in the striatum could increase glutamate release and then dopamine release. For this purpose, using intrastriatal

Correspondence: Professor Jean Costentin, as above.
E-mail: neuro.psyphar@univ-rouen.fr

Received 14 December 2003, revised 24 August 2004, accepted 30 August 2004

doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03723.x

microdialysis, we attempted to determine the effect of DPDPE injected into the striatum on local glutamate release and dopamine release. In addition, we assessed the ability of DPDPE to elicit these effects in animals previously submitted to a unilateral thermic lesion of the cortex region overlapping the striatum in order to destroy corticostriatal neurons. Finally, we measured the ^3H -DPDPE binding to striatal membranes prepared from the striatum ipsilateral to this lesion.

Materials and methods

Animals

The experiments were performed on male Sprague-Dawley rats (250–300 g; Charles River, Saint-Aubin-lès-Elbeuf, France). They were maintained on a 12 h/12 h light/dark cycle at room temperature (22 °C) under constant ventilation and had free access to food and water *ad libitum*. All animal manipulations were performed according to recommendations of the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). All efforts were made to reduce the number of animals used in this study.

Surgery

Animals were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, *i.p.*) and placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, CA, USA). The skull was exposed and two holes were drilled. Unilateral lesions of the right frontal cortex were carried out by direct thermocoagulation of the cerebral tissue at two sites (A/P, +3.4 mm; M/L, –3.0 mm; D/V, –1.0 mm and A/P, +0.5 mm; M/L, –3.0 mm; D/V, –0.8 mm relative to dura and bregma) according to Paxinos & Watson (1986). The thermocoagulation was performed with an electrode (length, 4 mm; diameter, 0.5 mm; Thermistor Electrode; Radionics, Burlington, MA, USA) connected to a radiofrequency generator (RFG-4; Radionics) that delivered a current set at 15 V for 50 s. The electrode was removed and the holes were filled with bee's wax. Two groups of rats were allowed to recover for 2 days before binding experiments or cresyl violet staining of sections. Another group was stereotaxically implanted in the ipsilateral striatum (A/P, +0.5 mm; M/L, –3.0 mm; D/V, 3.5 mm relative to dura and bregma according to Paxinos & Watson, 1986) with a microdialysis guide cannula (Carnegie Medicin, Sweden) fixed with two stainless steel screws and dental acrylic resin (Texton; SS White, UK; Dentsply; DeTrey, UK). These animals, individually housed, were allowed to recover from surgery for 2 days before to the microdialysis experiments.

Microdialysis experiments

Two days after surgery, a probe (membrane: length, 3 mm; outer diameter, 0.24 mm; relative recovery, evaluated with known concentrations of glutamate and dopamine, in the range of 10–15%; CMA, Sweden) was inserted into the guide cannula, connected to a micropump (CMA/100; CMA) and perfused with Ringer's solution (in mM: NaCl, 145; KCl, 2.7; CaCl₂, 1.2 and MgCl₂, 1, pH 7.4) at a flow rate of 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$. The animals, placed in a Plexiglas bowl, were free to move. After a 2-h equilibration period, successive 20- μL samples were collected in vials containing 10 μL of iced perchloric acid (0.1 M) and cysteine (1 g/L) and were stored at –80 °C until assayed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The dead volume of catheter, between the probe and the collection vials, was 10 μL ; thus glutamate and dopamine concentration measurements were delayed by 10 min relative to considered events. The first three samples were used to determine the basal release and then treatment

[DPDPE (10 μM) alone; *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (PDC) (2 mM) alone or PDC (2 mM) + DPDPE (10 μM)] was added to the perfusion medium for 20 min and the four successive samples were collected. In control experiments performed to test the TTX and calcium sensitivity of basal dialysate levels of glutamate and dopamine in our microdialysis procedures, TTX (10 μM) and calcium-free medium (in mM: NaCl, 129.5; KCl, 2.7 and MgCl₂, 12.5, pH 7.4) were perfused for 60 min. The probe position into striatum was checked during the dissection by macroscopic observation.

Preparation of samples for neurotransmitter content determination

At the end of dialysis experiments, animals were killed by decapitation. The brains were quickly removed, striata were dissected on ice (Glowinski & Iversen, 1966) and homogenized by sonication at high frequency (70 Hz) for 4 s using a Vibra Cell Sonicator (Sonics and Materials, CT, USA) in ice-cold perchloric acid (0.1 mol/L) containing 1 g/L cysteine. Homogenates were centrifuged (10 000 g, 10 min) and the supernatant fluids were filtered by pressure through 0.45- μm filters (Millipore, Ireland) before glutamate or dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) determinations. The pellets were resuspended in NaOH (0.1 M) and used for protein determination according to the method of Lowry *et al.* (1951).

Determination of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid

Levels of dopamine and DOPAC were determined using a reverse-phase ion-pair HPLC system with electrochemical detection. The HPLC system consisted of a pump (LC200; Perkin Elmer, CT, USA) connected to a C18 reversed phase column (2.0 \times 250 mm, 5 μm ; Beckman-Coulter, CA, USA) coupled to an electrochemical detector (Decade; Antec Leyden, Netherlands) with a glassy carbon electrode set at 0.8 V vs. an Ag/AgCl reference electrode. The mobile phase consisted of KH₂PO₄, 55 mM; methanol, 64 mL/L; Pic B7 (Sodium heptanesulphonate, Waters, Milford, MA, USA), 23.5 mL/L and Na₂EDTA, 0.150 mM at pH 3.55. It was filtered through 0.45- μm filters (Millipore) and delivered at a flow rate of 0.3 mL/min. Samples (20 μL) were injected into the HPLC system by means of an automatic device (AS 300; Spectra Physics, CA, USA). Chromatograms were recorded and integrated by PC integration Borwin software (JMBS Developments, France). The detection limit at a signal-to-noise ratio of 3 was less than 5 nmol/ μL .

Determination of glutamate

Levels of glutamate were determined by an HPLC system using a prior derivatization at 4 °C by adding 15 μL of sample to the same volume of reactive solution prepared with *o*-phthalaldehyde (40 mM) in a 0.4 M borate buffer (pH 10.4) containing ethanol (100 g/L) and 2-mercaptoethanol (4 g/L). The 100-s derivatization was followed by separation and detection using an HPLC system with electrochemical detection. A C18 reversed phase column (2.0 \times 250 mm, 5 μm ; Beckman) was coupled with an electrochemical detector (Decade; Antec Leyden) with a glassy carbon electrode set at 0.6 V vs. an Ag/AgCl reference electrode. The mobile phase consisted of Na₂HPO₄ (0.1 M), methanol (270 g/L) and Na₂EDTA (0.150 mM) (pH 6), it was filtered through 0.45- μm filters (Millipore) and delivered by a pump (LC200; Perkin Elmer) at a flow rate of 0.3 mL/min. Samples (20 μL) were then injected into the HPLC system by means of an automatic device (AS 300; Spectra Physics).

Chromatograms were recorded and integrated using PC integration Borwin software (JMBS Developments). The detection limit at a signal-to-noise ratio of 3 was less than 5 pmol/ μ L.

Measure of synaptosomal glutamate and dopamine uptake

Two days after the cortical lesion, a group of animals was killed by decapitation, the brains were quickly removed and striata were dissected on ice according to Glowinski & Iversen (1966) and homogenized in 20 volumes of saccharose (0.32 M) at 4 °C using a teflon-glas homogenizer (Potter-Elvehjem, clearance 80–130 mm). The homogenate was centrifuged (1000 g, 10 min) at 4 °C and the pellet discarded. The supernatant fluid was used as a crude synaptosomal preparation. Aliquots of the preparation (50 μ L) were preincubated at 37 °C for 5 min in Krebs-Ringer medium (final volume 1 mL; in mM: NaCl, 109; CaCl₂, 1; KH₂PO₄, 1.1; NaHCO₃, 27; glucose, 5.4; pH 7.4). In dopamine uptake experiments, 10 μ L of a solution containing [³H]-dopamine (specific activity 6.6 Ci/mmol; final concentration 20 nM; Amersham, UK) and pargyline, a monoamine oxidase inhibitor (final concentration 100 μ M), were added to the synaptosomal preparation for a 5-min incubation period. In glutamate uptake experiments, this 10- μ L solution contained L-[G-³H]-glutamic acid (specific activity 49.0 Ci/mmol; final concentration 4 nM; Amersham) and 3-mercaptopyruvic acid, a glutamic acid decarboxylase inhibitor (final concentration 10 μ M). The reaction was stopped by dilution with 2 mL of ice-cold incubation buffer and centrifugation (3000 g, 10 min) at 4 °C. The pellet was washed, recentrifuged and then resuspended in distilled water; aliquots of the suspension were used for the determination of radioactivity by liquid scintillation and for the determination of protein concentration according to Lowry *et al.* (1951). The specific uptake of dopamine and glutamate was defined as the difference between the total uptake at 37 °C and the non-specific accumulation at 0 °C.

Binding to δ -opioid receptors on striatal membranes

Scatchard analysis of the [³H]-DPDPE binding to striatal membranes purified from control animals was performed to determine the K_D value in our experimental conditions. The membranes (400 μ g) were incubated for 3 h at 37 °C in the presence of [³H]-DPDPE (concentration range 0–25 nM). The 4 nM [³H]-DPDPE concentration was then chosen for the following experiments.

Two days after surgery, sham-lesioned or lesioned animals intended for *in vitro* binding were killed by decapitation. Their striata were quickly removed on ice and homogenized in 20 vol. of an ice-cold Tris-HCl buffer (50 mM; pH 7.4) using a Potter-Elvehjem homogenizer (clearance 80–130 mm). The homogenate was centrifuged (17 000 g, 20 min, 4 °C) and the pellet resuspended in the same volume of Tris-HCl buffer and centrifuged once again (40 000 g, 15 min, 4 °C). For the binding assay the resultant pellet was suspended in 250 μ L of Tris-HCl buffer by sonication (microprobe diameter 3 mm; Sonics and Materials) for 5 s to obtain the membrane preparation. The concentration of protein in each sample was 400 μ g as determined by the method of Lowry *et al.* (1951). Aliquots of membrane were incubated at 37 °C for 3 h in the Tris-HCl buffer containing [³H]-DPDPE (4 nM; specific activity 45 Ci/mmol; Amersham). Incubations were stopped by dilution and rinsing with 40 mL of ice-cold Tris buffer and rapid vacuum filtration through GF/B glass fibre filters (Whatman, UK) previously soaked for at least 1 h in the Tris-HCl buffer containing polyethyleneimine (1%). The radioactivity was measured by liquid scintillation spectrometry (Betamatic V;

Kontron, France) in 4 mL Ultima Gold (Packard Instrument, the Netherlands). All binding assays were carried out in duplicate. The specific binding of [³H]-DPDPE was defined as the difference in binding observed in the absence and presence of 100 μ M naltrindole. The amount of specific binding of the ligand was expressed as pmol/mg protein.

Drugs

The DPDPE, naltrindole and PDC, purchased from Sigma (France), were dissolved in Ringer's solution and the pH was adjusted to 7.4. [³H]-L-glutamate, [³H]-dopamine and [³H]-DPDPE were provided by Amersham (France).

Statistical analysis

Microdialysis data were expressed as a percentage of basal values evaluated on the first three samples and statistical analysis was performed on these data (average of basal glutamate or dopamine content was also expressed in each group as concentrations). The effects of TTX and calcium-free medium on basal glutamate and dopamine dialysate levels and those of naltrindole, PDC or cortical lesion on DPDPE-induced striatal glutamate and/or dopamine releases were evaluated by using ANOVA followed by Tukey's tests. The effects of the lesion on striatal concentrations of glutamate, dopamine and DOPAC, on synaptosomal uptake of either dopamine or glutamate and on striatal binding of radiolabelled DPDPE were evaluated by using an ANOVA or a Student's *t*-test. Statistical analyses were performed both with SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Statview (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) software and the probability was considered as significant for $P < 0.05$.

Results

Extent of the lesion produced by cortical thermocoagulation evaluated on cresyl violet-stained striatal sections

Two days after the lesion, we observed a cortical destruction stretching on a frontoparietal field on frontal sections stained by cresyl violet (Fig. 1A and B). Ventrally, the lesion reached the corpus callosum but the integrity of the underlying striatum was preserved. Nevertheless, this histological analysis revealed a shrinking of the striatum ipsilateral to the decortication. In fact, the total area of the ipsilateral striatum (evaluated from the second section plane illustrated in Fig. 1B) was significantly reduced in lesioned animals as compared with the contralateral side (9.7 ± 0.8 vs. 12.5 ± 0.4 mm², respectively; -22.4% ; $t = 3.3$; $P < 0.01$; $n = 8$) or the ipsilateral striatum of control animals (9.7 ± 0.8 vs. 11.9 ± 0.5 mm², respectively; -18.6% ; $t = 2.49$; $P < 0.05$; $n = 8$). However, no reduction was observed in the total number of neurons (evaluated on a large dorsomedial area of the same section plane) in the striatum ipsilateral to the lesion as compared with the contralateral ($13\,500 \pm 1347$ vs. $15\,044 \pm 730$ neurons, respectively; $t = 1.0$; $P > 0.05$; $n = 8$) or the ipsilateral striatum of control rats ($13\,500 \pm 1347$ vs. $14\,120 \pm 828$ neurons, respectively; $t = 0.4$; $P > 0.05$; $n = 8$).

Effect of cortical thermocoagulation on glutamatergic index in rat striatum

The cortical lesion produced a significant decrease in glutamate content in the ipsilateral striatum (63.4 ± 16.8 nmol/mg of proteins in striatum

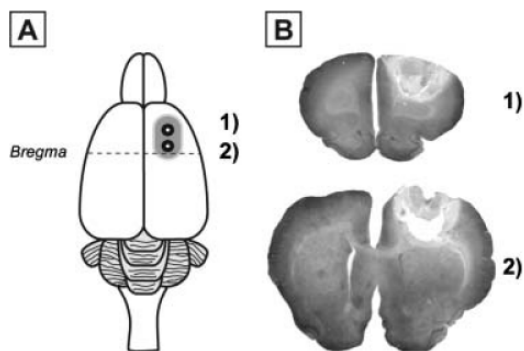


FIG. 1. Evaluation of the cortical thermocoagulation on cresyl violet-stained striatal sections. (A) The lesion of corticostriatal neurons was performed by thermocoagulation of the right frontal cortex at two points [according to the atlas of Paxinos & Watson (1986); A/P, +3.4 and +0.5 mm; M/L, -3.0 mm and D/V, -1.0 and -0.8 mm, respectively] with an intensity of 15 V and an application time of 50 s. The cortical field destroyed by the lesion included almost all of the frontal cortex and a small part of the parietal area. (B) Brain sections through the two lesioned points depicted in A stained with cresyl violet and then photographed in grey scales.

ipsilateral to the lesion as compared with 91.0 ± 20.7 nmol/mg of proteins in contralateral striatum; -30.3% , $F_{1,18} = 18.74$; $P < 0.001$; $n = 10$). In contrast, the concentration of glutamate in dialysates collected from the ipsilateral striatum was not significantly decreased in lesioned rats (15.8 ± 3.5 vs. 22.6 ± 3.6 pmol/min in controls; $t = 1.35$; $P > 0.05$; $n = 20$). Likewise, the synaptosomal uptake of radiolabelled glutamate in the ipsilateral striatum of lesioned animals (1.15 ± 0.18 pmol/mg of proteins) was unaltered as compared with the contralateral striatum (1.00 ± 0.19 pmol/mg of proteins; $F_{1,19} = 1.849$, $P > 0.05$; $n = 10$).

Effect of cortical thermocoagulation on dopaminergic index in rat striatum

Two days after the unilateral cortex lesioning, the striatal content of dopamine was 2.4 ± 0.4 nmol/mg of proteins in the ipsilateral striatum vs. 2.5 ± 0.3 nmol/mg of proteins in the striatum contralateral to the lesion ($F_{1,18} = 0.106$; $P > 0.05$; $n = 10$). The DOPAC level was 0.42 ± 0.09 nmol/mg of proteins in the striatum contralateral to the lesion vs. 0.50 ± 0.12 nmol/mg of proteins in the ipsilateral striatum ($F_{1,12} = 0.02$; $P > 0.05$; $n = 7$).

The synaptosomal [3 H]-dopamine uptake by synaptosomes prepared from the ipsilateral striatum (82.6 ± 25.2 pmol/mg of proteins; $F_{1,18} = 2.581$, $P > 0.05$; $n = 10$) did not significantly differ from that measured on synaptosomes prepared from the striatum contralateral to the cortical lesion (61.2 ± 14.7 pmol/mg of proteins). Similarly, the basal dialysate level of dopamine was not significantly modified (30.2 ± 8.3 fmol/min in the striatum of lesioned rats vs. 31.8 ± 5.8 fmol/min in that of control rats; $t = 0.32$; $P > 0.05$; $n = 20$).

Effect of an intrastriatal infusion of [D-Pen²,D-Pen⁵]-enkephalin on the striatal glutamate dialysate level in cortex-lesioned and control rats

In our microdialysis procedure, basal dialysate levels of glutamate were stable for each group in samples collected before the

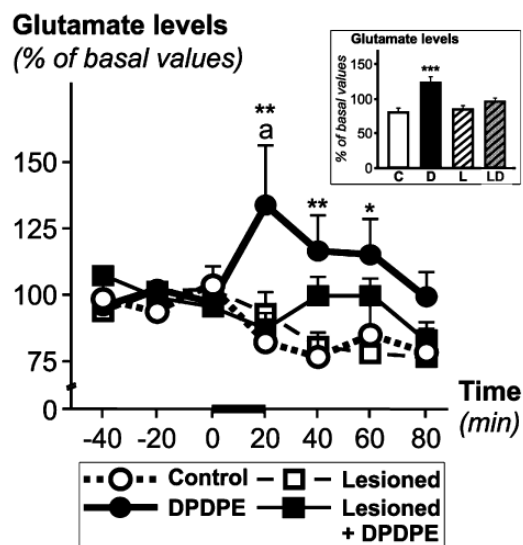


FIG. 2. Effect of [D-Pen²,D-Pen⁵]-enkephalin (DPDPE) on glutamate dialysate levels in striatum of rats submitted or not to cortical thermocoagulation. Before implantation of a guide cannula in the right striatum, animals were submitted or not to thermocoagulation of the right frontal cortex ($t = 15$ V, $t = 50$ s). Two days later, a microdialysis probe was inserted in the cannula and perfused with Ringer's solution at a flow rate of $1.0 \mu\text{L}/\text{min}$. After a 2-h equilibration period, successive $20\text{-}\mu\text{L}$ samples were collected and analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine their glutamate content. The first three samples, used to determine the basal release of glutamate, were followed by the infusion of DPDPE ($10 \mu\text{M}$) for 20 min. The basal glutamate level in dialysates, measured during the collection of the first three samples, was 22.6 ± 3.6 pmol/min in unlesioned rats ($n = 20$) vs. 15.8 ± 3.5 pmol/min in lesioned rats ($n = 20$). Data are expressed as percentages of basal glutamate concentration in dialysates. Means \pm SEM of 10 rats per group are compared using a two-way ANOVA followed by a Tukey's test. $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$ vs. control group. $^{a}P < 0.05$ vs. lesioned and DPDPE-treated group. Inset: mean glutamate release evaluated during the 60 min following the perfusion of Ringer's solution in control (C) or cortex-lesioned (L) animals and in control (D) or cortex-lesioned (LD) rats submitted to the DPDPE administration. $^{***}P < 0.001$, $n = 10$.

intrastriatal infusion of DPDPE (Fig. 3, first three collected dialysates). However, these basal levels of glutamate were unaffected by TTX ($10 \mu\text{M}$) administration ($F_{10,65} = 1.868$; $P > 0.05$; $n = 6$) or calcium suppression ($F_{10,65} = 1.909$; $P > 0.05$; $n = 6$). The infusion of DPDPE ($10 \mu\text{M}$) into the striatum of non-lesioned rats increased, 20 min later, the level of glutamate in dialysate by 34.2% (expressed as a percentage of basal dialysate levels of glutamate) in a statistically significant manner ($P < 0.01$; $n = 10$). The glutamate concentration in dialysates returned to baseline after 60–80 min. Furthermore, DPDPE totally lost its stimulatory effect on glutamate dialysate levels when naltrindole ($10 \mu\text{M}$) was added to the perfusion medium (treatment \times time; $F_{8,143} = 0.690$; $P > 0.05$; $n = 8$), naltrindole itself having no effect on glutamate dialysate levels (treatment \times time, $F_{8,143} = 0.923$; $P > 0.05$; $n = 8$). Likewise, the decortication totally prevented the DPDPE-induced increase in glutamate dialysate levels measured in the striatum ipsilateral to the lesion (Fig. 2).

Three-factor ANOVA carried out from these data (relative values), with decortication, treatment and time as factors, demonstrated treatment \times time ($F_{6,252} = 2.62$; $P = 0.018$) and decortication \times treatment ($F_{1,252} = 5.21$; $P = 0.023$) interactions. Specifically,

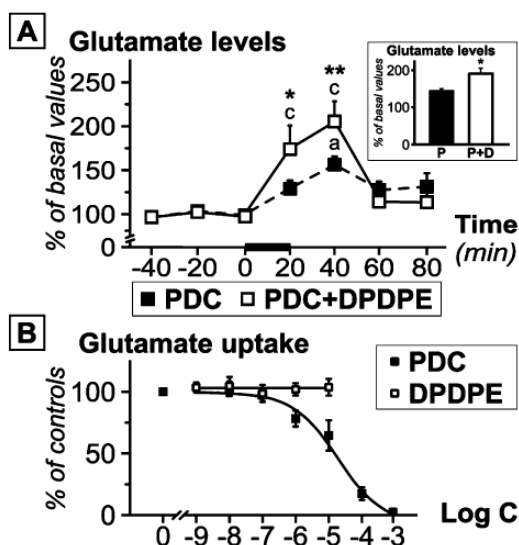


FIG. 3. Effects of *L-trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (PDC) on [*D*-Pen²,*D*-Pen⁵]-enkephalin (DPDPE)-induced glutamate dialysate levels and of DPDPE on synaptosomal glutamate uptake. (A) After a 2-h equilibration period, successive 20- μ L microdialysis samples were collected and analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine their glutamate content. The first three samples, used to determine the basal release of glutamate, were followed by the infusion of PDC (2 mM) or by the co-infusion of PDC (2 mM) and DPDPE (10 μ M) for 20 min. The basal glutamate level in dialysates, measured during the collection of the first three samples, was 22.6 ± 6.5 pmol/min in PDC-treated rats ($n = 9$) vs. 19.1 ± 2.9 pmol/min in rats treated with PDC + DPDPE ($n = 9$). Data are expressed as percentages of basal glutamate concentration in dialysates. Means \pm SEM of 9 rats per group are compared using a two-way repeated measures ANOVA followed by a Tukey's test. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. PDC group. ^a $P < 0.05$, ^c $P < 0.001$ by comparison with basal dialysate levels. Inset: mean glutamate release evaluated during the 40 min following the infusion of PDC (P) or the co-infusion of PDC and DPDPE (P + D). * $P < 0.05$, $n = 9$. (B) [³H]-L-glutamate uptake (4 nM) was performed for 5 min on crude synaptosomes obtained from rat striatum in the presence of either PDC (final concentration 10 nM to 1 mM) or DPDPE (final concentration 1 nM to 10 μ M). Data are expressed as percentages of the [³H]-L-glutamate uptake measured in control conditions (1.49 ± 0.05 pmol/mg of proteins). Results are the mean \pm SEM of three experiments.

two-way repeated measures ANOVA performed on the data of unlesioned and lesioned animals revealed that the 20-min infusion of DPDPE (10 μ M) produced a significant increase in glutamate level (treatment \times time, $F_{6,108} = 2.57$; $P = 0.023$) in the three samples following the onset of the striatal DPDPE infusion in unlesioned rats, when it was ineffective in ipsilateral striatum of lesioned rats (treatment \times time, $F_{6,108} = 2.05$; $P > 0.05$). Two-way ANOVA performed on cumulated data (mean of the three samples with DPDPE effect) indicated that the interaction decortication \times treatment was significant ($F_{1,36} = 4.25$; $P = 0.047$) as well as the increase of glutamate levels induced by DPDPE (+22.7%; $P < 0.001$; $n = 10$; inset in Fig. 2).

Moreover, the stimulatory effect induced by DPDPE on glutamate dialysate levels persisted in the presence of the glutamate uptake inhibitor (PDC). In a statistically significant manner, the infusion of PDC (2 mM) increased, 40 min later, the level of glutamate in dialysate by 56.2% ($P = 0.033$; $n = 9$) while the co-infusion of PDC (2 mM) and DPDPE (10 μ M) produced an increase in glutamate levels of 105.3% ($P < 0.001$; $n = 9$; Fig. 3A). Two-factor repeated measures ANOVA, with treatment and time as factors, indicated a

treatment \times time interaction ($F_{7,143} = 2.406$; $P = 0.025$) and revealed that the 20-min co-infusion of PDC (2 mM) and DPDPE (10 μ M) produced an increase in glutamate dialysate levels significantly more important than that induced by the administration of PDC (2 mM) alone in the first ($F_{7,143} = 2.406$; $P = 0.014$) and second ($F_{7,143} = 2.406$; $P = 0.007$) samples following the beginning of treatment. One-way ANOVA performed on cumulated data (mean of the two samples following the beginning of treatments) indicated that the increase of glutamate levels induced by PDC (+42.6%) was significantly different from that induced by PDC + DPDPE (+89.6%; $P = 0.011$; $n = 9$; inset in Fig. 3A).

Effect of [*D*-Pen²,*D*-Pen⁵]-enkephalin on the [³H]-L-glutamate uptake operated in vitro by striatal synaptosomes

[³H]-L-glutamate uptake experiments performed on striatal synaptosomes revealed that, at the maximal dose used in our microdialysis studies, DPDPE had no effect on synaptosomal glutamate uptake. On the contrary, PDC was found to inhibit this uptake with an IC₅₀ value of 11.7 ± 0.6 μ M (Fig. 3B).

Effect of an intrastriatal infusion of [*D*-Pen²,*D*-Pen⁵]-enkephalin on the striatal dopamine dialysate level in cortex-lesioned and control rats

Basal dialysate levels of dopamine, which in our experimental conditions were extensively reduced by the application of TTX (10 μ M) (-79.3%; $F_{10,65} = 5.706$; $P < 0.001$; $n = 6$) or by the replacement of calcium with magnesium (-100.0%; $F_{10,65} = 6.127$; $P < 0.001$; $n = 6$), were stable in each group before the treatment with DPDPE (Fig. 4, first three collected dialysates). Infusion of DPDPE (10 μ M) into the striatum significantly increased the levels of dopamine in dialysate (expressed as percentage of basal dialysate levels of dopamine) by 59.0% ($P < 0.001$, $n = 10$) 20 min later; the level returned to baseline after 40–60 min in the striatum of control rats. Decortication led to an abolition of the effect of DPDPE on dopamine release in the striatum ipsilateral to the lesion.

Three-factor ANOVA performed on these data (relative values), with decortication, treatment and time as factors, showed a decortication \times treatment ($F_{1,252} = 5.55$; $P = 0.019$) interaction. Specifically, two-way repeated measures ANOVA performed on unlesioned and lesioned animals revealed that a 20-min infusion of DPDPE (10 μ M) produced a significant increase in dopamine level (treatment \times time; $F_{6,108} = 6.62$; $P = 0.021$) in the two samples following the onset of the striatal DPDPE infusion in unlesioned rats whereas it was ineffective in ipsilateral striatum of lesioned rats (treatment \times time; $F_{6,108} = 0.45$; $P > 0.05$). According to the analysis carried out for glutamate release, a two-way ANOVA was also performed on cumulated data from the three samples following the onset of DPDPE administration. This analysis indicated that the interaction between decortication and treatment was significant ($F_{1,36} = 4.065$; $P = 0.039$) as well as the increase of dopamine induced by DPDPE (+37.3%; $P < 0.01$, $n = 10$; inset in Fig. 4).

Effect of a cortical thermocoagulation on [³H]-[*D*-Pen²,*D*-Pen⁵]-enkephalin binding to a membrane fraction prepared from striatum

Scatchard analysis of the [³H]-DPDPE binding to striatal membranes purified from control animals performed in the presence of [³H]-DPDPE (concentration range 0–25 nM) revealed the existence

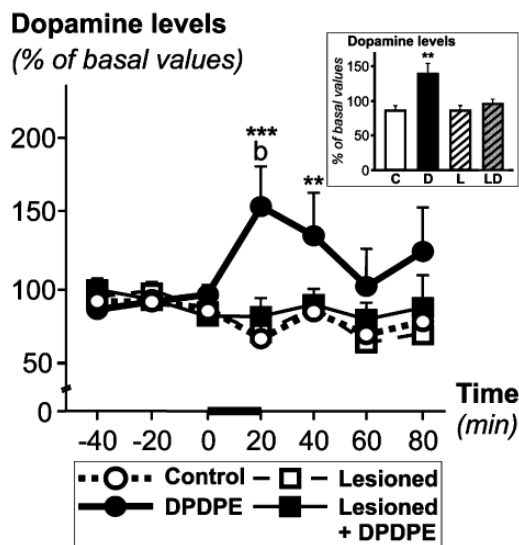


FIG. 4. Effect of [D-Pen²,D-Pen⁵]-enkephalin (DPDPE) on dopamine dialysate levels in striatum of rats submitted or not to cortical thermocoagulation. Before implantation of a guide cannula in the right striatum, animals were submitted or not to thermocoagulation of the right frontal cortex ($t = 15$ V, $t = 50$ s). Two days later, a microdialysis probe was inserted in the cannula and perfused with Ringer's solution at a flow rate of 1.0 μ L/min. After a 2-h equilibration period, successive 20- μ L samples were collected and analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine their dopamine content. The first three samples, used to determine the basal release of dopamine, were followed by the infusion of DPDPE (10 μ M) for 20 min. The basal dopamine level in dialysates, measured during the collection of the first three samples, was 31.8 ± 5.8 fmol/min in unlesioned rats ($n = 20$) vs. 30.2 ± 8.3 fmol/min in lesioned rats ($n = 20$). Data are expressed as percentages of basal dopamine in dialysates. Means \pm SEM of 10 rats per group are compared using a two-way ANOVA followed by a Tukey's test. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ vs. control group. ^b $P < 0.01$ vs. lesioned and DPDPE-treated group. Inset: mean dopamine release evaluated during the 60 min following the perfusion of Ringer's solution in control (C) or cortex-lesioned (L) animals and in control (D) or cortex-lesioned (LD) rats submitted to the DPDPE administration. ** $P < 0.01$, $n = 10$.

of a single binding site with a K_D of 3.1 ± 0.4 nM and a B_{max} value of 493.0 ± 19.4 pmol/mg of proteins ($n = 3$ experiments).

The [³H]-DPDPE binding was then evaluated at a [³H]-DPDPE concentration of 4 nM on a membrane fraction prepared from the whole striatum 2 days after the thermocoagulation of the right overlapping cortex. In control animals, no difference was observed in striatal specific binding of [³H]-DPDPE between the two cerebral hemispheres (70.7 ± 5.0 fmol/mg of proteins in the ipsilateral vs. 65.1 ± 6.1 fmol/mg of proteins in the contralateral striatum; $F_{1,10} = 2.371$; $P > 0.05$; $n = 11$). The cortical thermocoagulation significantly decreased this binding on striatal membranes prepared from the striatum ipsilateral to the lesioned cortex comparatively to contralateral striatum (58.1 ± 6.8 vs. 71.3 ± 6.5 fmol/mg respectively; -18.5% ; $F_{1,10} = 11.229$; $P = 0.007$; $n = 11$).

Discussion

The present study shows the effects of DPDPE, a selective agonist of δ -opioid receptors (for review see Quock *et al.*, 1999), on striatal glutamate and dopamine release in control and cortically lesioned rats. Striatal infusion of DPDPE locally increased both striatal glutamate

and dopamine release of unlesioned rats whereas it lost its effects in the striatum of rats submitted to a lesion of the overlapping cortex. In addition, we observed that decortication resulted in a lower binding of [³H]-DPDPE in the ipsilateral striatum. These results argue in favour of a location of δ -opioid receptors on corticostriatal nerve endings and for the involvement of these receptors in the release of glutamate, known to trigger dopamine release in the rat striatum.

Effect of cortical thermocoagulation on the integrity of the ipsilateral striatum

Cresyl violet staining of cerebral sections carried out in lesioned animals revealed that the cortical thermocoagulation affected a large part of the frontoparietal cortex but spared the underlying striatum. However, a decreased size of the striatum ipsilateral to the lesion was observed. Nevertheless, the total number of striatal neurons was unchanged, on account of an increased cell-packing density. As the ipsilateral striatum was never directly affected by the lesion, this striatal shrinkage could be due to the loss of corticostriatal afferents. However, we cannot exclude that a modification in the morphology of the striatum resulting from the loss of the mechanical protection produced by the ipsilateral cortex (especially during the stage of brain freezing) could participate in this reduction of striatal volume.

Effect of cortical thermocoagulation on the striatal glutamatergic transmission

Striatal glutamate arises from various sources: corticostriatal neurons, which represent the major afferent input to the striatum (Kemp & Powell, 1971; Vuillet *et al.*, 1989) and originate from either ipsilateral or contralateral cortex (McGeorge & Faull, 1989), thalamostriatal neurons (Berendse & Groenewegen, 1990) as well as glial cells and non-glutamatergic neurons via the Krebs cycle. Thus, the significant decrease (approximately -30%) of total glutamate content occurring in the ipsilateral striatum 2 days after frontoparietal cortex lesion suggests an important loss of glutamatergic terminals. This result is similar to previous reports (Hassler *et al.*, 1982; Butcher & Hamberger, 1987; Warena *et al.*, 1987; Desole *et al.*, 1992).

Glutamate uptake determined on synaptosomes prepared from the ipsilateral striatum of lesioned animals was unchanged 2 days after the cortical lesion. This result appears to be in discordance with the decrease of striatal glutamate levels and with some other studies showing a reduced striatal glutamate uptake in response to cortical lesioning (Divac *et al.*, 1977; Levy *et al.*, 1995; Lievens *et al.*, 2000). Nevertheless, in these studies, experiments were performed later (from 5 to 14 days) than the short delay of the present study. Moreover, in agreement with our results, Ginsberg *et al.* (1995) have also observed no modification in striatal glutamate uptake 2 days after cortical lesion. In addition, they reported that the reduced uptake observed in previously evoked studies was correlated with a late decrease in expression of glial glutamate transporters mRNA.

Likewise, basal concentrations of glutamate in dialysates collected by microdialysis from the ipsilateral striatum of lesioned animals were not significantly decreased in comparison with sham-lesioned animals. This result is in agreement with the study of Young & Bradford (1986) which reported no decrease in basal dialysate levels of striatal glutamate as compared with control animals 2 days after decortication. Furthermore, as previously reported (for review see Timmerman & Westerink, 1997; Del Arco *et al.*, 2003), basal dialysate levels of

glutamate measured in our experiments were also unaffected by either TTX infusion or calcium depletion, which indicates that basal extracellular glutamate measured by microdialysis is not directly related to the impulse-driven release of glutamate. Therefore, basal dialysate concentrations of glutamate probably reflect a non-exocytotic glutamate release, which could explain the absence of decreased basal glutamate levels in dialysates collected from the striatum ipsilateral to the cortical lesion.

Effect of cortical thermocoagulation on the striatal dopaminergic transmission

Two days after the cortical lesion, dopamine uptake operated by synaptosomes prepared from striatum was not modified in ipsilateral striatum, indicating the integrity of striatal dopaminergic nerve endings. Dopamine uptake is considered as a reliable index of dopamine innervation as it is not affected by various pharmacological treatments modifying the dopamine transmission (Naudon *et al.*, 1995). On the contrary, striatal dopamine levels may be modified by various pharmacological treatments or lesions. In some studies, cortical ablation produced a decrease in striatal dopamine levels (Boyeson & Feeney, 1985; Pasinetti *et al.*, 1991) but this was not observed in other studies (Hassler *et al.*, 1982; Scatton *et al.*, 1982; Desole *et al.*, 1992). More specifically, Pasinetti *et al.* (1991) reported such a decrease 10 days but not 3 days after cortical ablation, in a manner inversely related to striatal glial fibrillary acidic protein concentration. They concluded that the reduced dopamine content in the ipsilateral striatum probably reflects a neuronal remodelling of nigrostriatal terminals resulting from astrocytic reactions induced by the loss of corticostriatal afferents. In the present study, the striatal dopamine and DOPAC contents were not modified, suggesting that this effect was not yet perceptible at 2 days postlesioning.

As similarly shown in many other studies (Westerink *et al.*, 1987; Kemel *et al.*, 1989; Morari *et al.*, 1993), the basal dialysate concentration of dopamine measured in our intrastriatal microdialysis procedures revealed a strong dependence on TTX and calcium-free medium perfusion, validating the reliability of our microdialysis experiments. In cortically lesioned animals, this basal extracellular concentration of dopamine was unchanged 2 days after the lesion although Smolders *et al.* (1996) reported a reduction 2 weeks later. As the glutamatergic transmission tonically stimulates striatal dopamine release (Giorguieff-Chesselet *et al.*, 1979; Westerink *et al.*, 1989; Wang, 1991), the lack of modification in striatal dopaminergic transmission 2 days after the lesion appears consistent with the unchanged basal concentration of glutamate in dialysates observed in our study. Therefore, as any index of the dopaminergic transmission evaluated in this study was altered by the cortical lesion, this argues for a preservation of the functional integrity of nigrostriatal afferents concerning dopamine synthesis, dopamine uptake and possibly their ability to release dopamine in response to extracellular glutamate.

Effect of δ -opioid receptor stimulation on the striatal dopamine and glutamate dialysate levels

The present results show that the selective δ -opioid receptor agonist DPDPE (Mosberg *et al.*, 1983), at the 10 μ M concentration used in some other microdialysis studies (Dourmap *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 1994), increases both glutamate and dopamine dialysate levels in the striatum. The prevention of this effect by naltrindole (10 μ M)

indicates the involvement of δ -opioid receptors in the striatal release of glutamate. However, the effect of enkephalins on glutamate release has been poorly documented. Americ *et al.* (1986) reported a glutamate release induced by Met-enkephalin from striatal slices. However, Met-enkephalin has a low selectivity for δ -opioid receptors (Mansour *et al.*, 1995). Thus, the present study demonstrates the involvement of δ -opioid receptors in striatal glutamate release. The DPDPE-induced glutamate release is inconsistent with the negative modulation exerted by opioid agents on glutamatergic transmission in some structures (Jiang & North, 1992; Ueda *et al.*, 1995; Vlaskovska *et al.*, 1997; Ostermeier *et al.*, 2000). However, our results are in agreement with those of Rawls & McGinty (2000) who reported, in the rat striatum, the involvement of δ -opioid receptors in the amphetamine-induced glutamate release which was decreased by naltrindole, a δ -opioid receptor antagonist. Furthermore, the complete prevention of the DPDPE-induced glutamate release by cortical lesion indicates that the glutamate released by DPDPE arises from corticostriatal glutamatergic neurons. Finally, this increase in glutamate dialysate levels induced by DPDPE (10 μ M) persisted in the presence of the glutamate uptake inhibitor PDC (2 mM). In addition, DPDPE (10 μ M) was found to have no direct effect on the glutamate uptake operated by synaptosomes prepared from striatum. These results exclude the possibility that the DPDPE-induced release of glutamate could reflect an alteration of striatal glutamate uptake.

The modulation of dopamine release by δ -opioid receptors has been well documented. The dopamine release induced by agonists of δ -opioid receptors has been reported in striatum in various *in vitro* and *in vivo* conditions, such as superfused slices (Petit *et al.*, 1986), push pull cannula (Chesselet *et al.*, 1981), microdialysis (Dourmap *et al.*, 1990, 1992) or voltametry (Pentney & Gratton, 1991). In agreement with these authors, in the present study DPDPE significantly increased striatal dopamine release in non-lesioned animals. Schad *et al.* (1996) reported that naltrindole, a δ -opioid receptor antagonist, reduced the amphetamine-induced dopamine release in the striatum but had no effect on basal dopamine release. These results, as well as the effect of naltrindole on glutamate release (Rawls & McGinty, 2000), confirmed the role of δ -opioid receptors in the dopamine response to amphetamine but suggested a phasic modulation exerted by endogenous enkephalins on dopamine release. However, we have demonstrated that enkephalins have a tonic effect on dopamine release by striatal infusion of ketorphan, an inhibitor of enkephalin-degrading enzymes (Dourmap *et al.*, 1990). Concerning *in vitro* methods, Lubetzki *et al.* (1982) and Petit *et al.* (1986) showed an increase in basal dopamine release from striatal slices resulting from the perfusion of δ -opioid receptor agonists. In contrast, some other investigators did not observe any modification by δ -opioid receptor stimulation of the basal (Mulder *et al.*, 1984; De Vries *et al.*, 1989) or the electrically-stimulated (Schoffelmeier *et al.*, 1988) or potassium-stimulated release of [³H]-dopamine from striatal slices (Werling *et al.*, 1988). Moreover, Jhamandas & Marien (1987) reported that D-Ala², D-Leu enkephalin, a δ -opioid agonist, reduced the glutamate-evoked release of endogenous dopamine from striatal superfused slices in a naloxone-sensitive manner. These observations indicate that the positive modulation exerted by δ -opioid receptors on dopamine release is more easily observable by *in vivo* experiments, which suggests that the integrity of neuronal connections is required for this effect and that the involved mechanism is indirect. However, as either basal or evoked release of dopamine was studied in these *in vitro* experiments, it could also participate in the discordance of these results.

Effect of cortical thermocoagulation on the δ -opioid receptor-induced stimulation of the striatal dopamine and glutamate dialysate levels

The cortical lesion prevented both glutamate and dopamine release induced by DPDPE. This result is consistent with our previous studies demonstrating that dopamine release elicited by DPDPE was independent of striatal interneurons lesioned by kainic acid (Dourmap *et al.*, 1992) and was prevented by an antagonist of *N*-methyl-D-aspartate receptors (Dourmap & Costentin, 1994). It indicates that DPDPE, by stimulating striatal δ -opioid receptors, increases the glutamate release from terminals of glutamatergic corticostriatal neurons, triggering an increase in striatal dopamine release. Indeed, the dopamine release induced by glutamate is well documented; many studies have shown a direct glutamatergic control of striatal dopamine release through presynaptic receptors located on nigrostriatal dopaminergic terminals (Westerink *et al.*, 1989; Moghaddam *et al.*, 1990; Wang, 1991) as well as the involvement of the glutamatergic corticostriatal pathway in this effect (Nieoullon *et al.*, 1978; Smolders *et al.*, 1996).

Cellular location of δ -opioid receptors involved in the increase in glutamate and dopamine dialysate levels

The cortical thermocoagulation resulted in a significant loss of δ -opioid receptors in ipsilateral striatum. Furthermore, this lesion prevented the DPDPE-induced release of both glutamate and dopamine. Therefore, these results argue correlatively in favour of a location of the δ -opioid receptors involved in this effect on glutamatergic corticostriatal terminals. However, several autoradiographic studies (Waksman *et al.*, 1987; Warencya *et al.*, 1987) did not report any decrease in [³H]-Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Thr or [³H]-Met-enkephalin binding 3 weeks after cortical ablation. This discrepancy could be due to the low selectivity of these ligands for δ -opioid receptors and to the time lag between cortical ablation and binding experiments. The loss of δ -opioid receptors observed in the present study after cortical lesion shows that some δ -opioid receptors are located on glutamatergic corticostriatal terminals, when most of these receptors are known to be located on striatal cholinergic interneurons (Le Moine *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1994). However, Wang & Pickel (2001) have recently detected, in striatal patches, δ -opioid receptors on axon terminals that formed asymmetric synapses with spine heads, suggesting the presence of δ -opioid receptors on glutamatergic terminals. As δ -opioid receptors are generally known to negatively modulate neurotransmission (for review see Quock *et al.*, 1999), one may expect that the stimulation of these receptors could solely inhibit the striatal release of glutamate. However, direct stimulatory effects of opioid ligands on neurotransmission have also been demonstrated (for review see Smart & Lambert, 1996). Therefore, it cannot be excluded that negative and positive effects of δ -opioid receptors on neurotransmission coexist in striatum.

Conclusion

The present study indicates that, in rat striatum, by stimulating δ -opioid receptors probably associated with corticostriatal glutamatergic nerve endings, DPDPE induces glutamate release which, in turn, increases dopamine release. The glutamate/dopamine balance is generally thought to be an important factor in the induction of psychomotor troubles related to striatal dysfunction, especially in Parkinson's disease. Moreover, δ -opioid receptors have recently been reported to exert a therapeutic potential in the treatment of this

pathology (Hudzik *et al.*, 2000) and in dyskinesia resulting from the levodopa therapy (Henry *et al.*, 2001), although the knowledge of their exact interactions with glutamatergic and dopaminergic transmissions remains limited. The present study, in attempting to clarify this point, shows that DPDPE appears to act primarily on glutamatergic corticostriatal terminals and could provide new advances in understanding the function of striatal δ -opioid receptors.

Acknowledgements

We thank Dr Jean-Claude Do Rego for his assistance in binding experiments and Dr Richard Medeiros for his advice on editing the manuscript.

Abbreviations

DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; DPDPE, [D-Pen²,D-Pen⁵]-enkephalin; HPLC, high-performance liquid chromatography; PDC, *L*-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid.

References

- Americ, S.P., Meeley, M.P. & Reis, D.J. (1986) Met-enkephalin selectively increases the spontaneous release of amino acid neurotransmitters from rat striatal slices. *Neurosci. Lett.*, **66**, 73–78.
- Berendse, H.W. & Groenewegen, H.J. (1990) Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J. Comp. Neurol.*, **299**, 187–228.
- Boyesson, M.G. & Feeney, D.M. (1985) Striatal dopamine after cortical injury. *Exp. Neurol.*, **89**, 479–483.
- Butcher, S.P. & Hamberger, A. (1987) In vivo studies on the extracellular, and veratrine-releasable, pools of endogenous amino acids in the rat striatum: effects of corticostriatal deafferentation and kainic acid lesion. *J. Neurochem.*, **48**, 713–721.
- Chesselet, M.F., Cheramy, A., Reisine, T.D. & Glowinski, J. (1981) Morphine and delta-opiate agonists locally stimulate in vivo dopamine in cat caudate nucleus. *Nature*, **291**, 320–322.
- Del Arco, A., Segovia, G., Fuxe, K. & Mora, F. (2003) Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J. Neurochem.*, **85**, 23–33.
- Desole, M.S., Miele, M., Enrico, P., Esposito, G., Fresu, L., De Natale, G. & Miele, E. (1992) Effects of cortical ablation on apomorphine- and scopolamine-induced dopamine turnover and ascorbic acid catabolism in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.*, **219**, 67–74.
- De Vries, T.J., Schoffmeier, A.N., Delay-Goyet, P., Roques, B.P. & Mulder, A.H. (1989) Selective effects of [D-Ser2(O-t-butyl),Leu5]enkephalyl-Thr6 and [D-Ser2(O-t-butyl),Leu5]enkephalyl-Thr6 (O-t-butyl), two new enkephalin analogues, on neurotransmitter release and adenylyl cyclase in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.*, **170**, 137–143.
- Divac, I., Fonnum, F. & Storm-Mathisen, J. (1977) High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature*, **266**, 377–378.
- Dourmap, N. & Costentin, J. (1994) Involvement of glutamate receptors in the striatal enkephalin-induced dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.*, **253**, 9–11.
- Dourmap, N., Michael-Titus, A. & Costentin, J. (1990) Local enkephalins tonically modulate dopamine release in the striatum: a microdialysis study. *Brain Res.*, **524**, 153–155.
- Dourmap, N., Michael-Titus, A. & Costentin, J. (1991) Presynaptic modulation of striatal dopamine release by enkephalins. *Adv. Biosci.*, **82**, 101–102.
- Dourmap, N., Michael-Titus, A. & Costentin, J. (1992) Differential effect of intrastriatal kainic acid on the modulation of dopamine release by μ - and δ -opioid peptides: a microdialysis study. *J. Neurochem.*, **58**, 709–713.
- Ginsberg, S.D., Martin, L.J. & Rothstein, J.D. (1995) Regional deafferentation down-regulates subtypes of glutamate transporter proteins. *J. Neurochem.*, **65**, 2800–2803.
- Giorguieff-Chesselet, M.F., Besson, M.J., Cheramy, A. & Glowinski, J. (1979) Role of various amino acids on the modulation of dopamine release from nigro-striatal dopaminergic neurones. *J. Physiol.*, **75**, 611–613.
- Glowinski, J. & Iversen, L.L. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H]dopamine and [³H]dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.*, **13**, 655–669.

- Hassler, R., Haug, P., Nitsch, C., Kim, J.S. & Paik, K. (1982) Effect of motor and premotor cortex ablation on concentrations of amino acids, monoamines, and acetylcholine and on the ultrastructure in rat striatum. A confirmation of glutamate as the specific cortico-striatal transmitter. *J. Neurochem.*, **38**, 1087–1098.
- Henry, B., Fox, S.H., Crossman, A.R. & Brotchie, J.M. (2001) Mu- and delta-opioid receptor antagonists reduce levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, **171**, 139–146.
- Hudzik, T.J., Howell, A., Payza, K. & Cross, A.J. (2000) Antiparkinson potential of delta-opioid receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.*, **396**, 101–107.
- Jhamandas, K. & Marien, M. (1987) Glutamate-evoked release of endogenous brain dopamine: inhibition by an excitatory amino acid antagonist and an enkephalin analogue. *Br. J. Pharmacol.*, **90**, 641–650.
- Jiang, Z.G. & North, R.A. (1992) Pre- and postsynaptic inhibition by opioids in rat striatum. *J. Neurosci.*, **12**, 356–361.
- Kemel, M.L., Desban, M., Glowinski, J. & Gauchy, C. (1989) Distinct presynaptic control of dopamine release in striosomal and matrix areas of the rat caudate nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 9006–9010.
- Kemp, J.M. & Powell, T.P. (1971) The termination of fibres from the cerebral cortex and thalamus upon dendritic spines in the caudate nucleus: a study with the Golgi method. *Philos. Trans. R. Soc.*, **262**, 429–439.
- Le Moine, C., Kieffer, B., Gaveriaux-Ruff, C., Befort, K. & Bloch, B. (1994) Delta-opioid receptor gene expression in the mouse forebrain: localization in cholinergic neurons of the striatum. *Neuroscience*, **62**, 635–640.
- Levy, L.M., Lehre, K.P., Walaas, S.L., Storm-Mathisen, J. & Danbolt, N.C. (1995) Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, **7**, 2036–2041.
- Lievens, J.C., Salin, P., Had-Aissouni, L., Mahy, N. & Kerkerian-Le Goff, L. (2000) Differential effects of corticostriatal and thalamostriatal deafferentation on expression of the glutamate transporter GLT1 in the rat striatum. *J. Neurochem.*, **74**, 909–919.
- Lowry, O.H., Rosenbourg, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Lubetzki, C., Chesselet, M.F. & Glowinski, J. (1982) Modulation of dopamine release in rat striatal slices by delta opiate agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **222**, 435–440.
- Mansour, A., Fox, C.A., Burke, S., Meng, F., Thompson, R.C., Akil, H. & Watson, S.J. (1994) Mu, delta and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.*, **350**, 412–438.
- Mansour, A., Hoversten, M.T., Taylor, L.P., Watson, S.J. & Akil, H. (1995) The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Res.*, **700**, 89–98.
- Matsumoto, M., Yoshioka, M., Togashi, H., Hirokami, M., Tochihara, M., Ikeda, T., Smith, C.B. & Saito, H. (1994) mu-Opioid receptors modulate noradrenergic release from the rat hippocampus as measured by brain microdialysis. *Brain Res.*, **636**, 1–8.
- McGeorge, A.J. & Faull, R.L. (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, **29**, 503–537.
- Meucci, E., Delay-Goyet, P., Roques, B.P. & Zajac, J.M. (1989) Binding in vivo of selective mu and delta opioid receptor agonists: opioid receptor occupancy by endogenous enkephalins. *Eur. J. Pharmacol.*, **171**, 167–178.
- Moghaddam, B., Gruen, R.J., Roth, R.H., Bunney, B.S. & Adams, R.N. (1990) Effect of L-glutamate on the release of striatal dopamine: in vivo dialysis and electrochemical studies. *Brain Res.*, **518**, 55–60.
- Morari, M., O'Connor, W.T., Ungerstedt, U. & Fuxe, K. (1993) N-methyl-D-aspartic acid differentially regulates extracellular dopamine, GABA, and glutamate levels in the dorsolateral neostriatum of the halothane-anesthetized rat: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.*, **60**, 1884–1893.
- Morari, M., Marti, M., Sbrenna, S., Fuxe, K., Bianchi, C. & Beani, L. (1998) Reciprocal dopamine-glutamate modulation of release in the basal ganglia. *Neurochem. Int.*, **33**, 383–397.
- Mosberg, H.I., Hurst, R., Hruby, V.J., Gee, K., Yamamura, H.I., Galligan, J.J. & Burks, T.F. (1983) Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 5871–5874.
- Mulder, A.H., Wardeh, G., Hogenboom, F. & Frankhuysen, A.L. (1984) Kappa- and delta-opioid receptor agonists differentially inhibit striatal dopamine and acetylcholine release. *Nature*, **308**, 278–280.
- Nash, J.F. & Yamamoto, B.K. (1993) Effect of D-amphetamine on the extracellular concentrations of glutamate and dopamine in iprindole-treated rats. *Brain Res.*, **627**, 1–8.
- Naudon, L., Leroux-Nicollet, I., Raisman-Vozari, R., Botton, D. & Costentin, J. (1995) Time-course of modifications elicited by reserpine on the density and mRNA synthesis of the vesicular monoamine transporter, and on the density of the membrane dopamine uptake complex. *Synapse*, **21**, 29–36.
- Nieoullon, A., Cheramy, A. & Glowinski, J. (1978) Release of dopamine evoked by electrical stimulation of the motor and visual areas of the cerebral cortex in both caudate nuclei and in the substantia nigra in the cat. *Brain Res.*, **145**, 69–83.
- Ostermeier, A.M., Schlosser, B., Schwender, D. & Sutor, B. (2000) Activation of mu- and delta-opioid receptors causes presynaptic inhibition of glutamatergic excitation in neocortical neurons. *Anesthesiology*, **93**, 1053–1063.
- Pasinetti, G.M., Kohama, S., Reinhard, J.F. Jr, Cheng, H.W., McNeill, T.H. & Finch, C.E. (1991) Striatal responses to decortication. I. Dopaminergic and astrocytic activities. *Brain Res.*, **567**, 253–259.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd Edn. Academic Press, San Diego.
- Pentney, R.J. & Gratton, A. (1991) Effects of local delta and mu opioid receptor activation on basal and stimulated dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rat: an in vivo electrochemical study. *Neuroscience*, **45**, 95–102.
- Petit, F., Hamon, M., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P. & Glowinski, J. (1986) Further evidence for a role of delta-opiate receptors in the presynaptic regulation of newly synthesized dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.*, **126**, 1–9.
- Quock, R.M., Burkey, T.H., Varga, E., Hosohata, Y., Hosohata, K., Cowell, S.M., Slate, C.A., Ehler, F.J., Roeske, W.R. & Yamamura, H.I. (1999) The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacol. Rev.*, **51**, 503–532.
- Rawls, S.M. & McGinty, J.F. (2000) Delta opioid receptors regulate calcium-dependent, amphetamine-evoked glutamate levels in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.*, **861**, 296–304.
- Reid, M.S., Hsu, K. & Berger, S.P. (1997) Cocaine and amphetamine preferentially stimulate glutamate release in the limbic system: studies on the involvement of dopamine. *Synapse*, **27**, 95–105.
- Scatton, B., Worms, P., Lloyd, K.G. & Bartholini, G. (1982) Cortical modulation of striatal function. *Brain Res.*, **232**, 331–343.
- Schad, C.A., Justice, J.B. Jr & Holtzman, S.G. (1996) Differential effects of delta- and mu-opioid receptor antagonists on the amphetamine-induced increase in extracellular dopamine in striatum and nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, **67**, 2292–2299.
- Schoffmeier, A.N., Rice, K.C., Jacobson, A.E., Van Gelderen, J.G., Hogenboom, F., Heijna, M.H. & Mulder, A.H. (1988) Mu-, delta- and kappa-opioid receptor-mediated inhibition of neurotransmitter release and adenylate cyclase activity in rat brain slices: studies with fentanyl isothiocyanate. *Eur. J. Pharmacol.*, **154**, 169–178.
- Smart, D. & Lambert, D.G. (1996) delta-Opioids stimulate inositol 1,4,5-trisphosphate formation, and so mobilize Ca²⁺ from intracellular stores, in undifferentiated NG108-15 cells. *J. Neurochem.*, **66**, 1462–1467.
- Smolders, I., Sarre, S., Vanhaesendonck, C., Ebinger, G. & Michotte, Y. (1996) Extracellular striatal dopamine and glutamate after decortication and kainate receptor stimulation, as measured by microdialysis. *J. Neurochem.*, **66**, 2373–2380.
- Spanagel, R., Herz, A. & Shippenberg, T. (1990) The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.*, **55**, 1734–1740.
- Timmerman, W. & Westerink, B.H. (1997) Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse*, **27**, 242–261.
- Ueda, M., Sugimoto, K., Oyama, T., Kuraishi, Y. & Satoh, M. (1995) Opioidergic inhibition of capsaicin-evoked release of glutamate from rat spinal dorsal horn slices. *Neuropharmacology*, **34**, 303–308.
- Vlaskovska, M., Schramm, M., Nylander, I., Kasakov, L., You, Z.B., Herrera-Marschitz, M. & Terenius, L. (1997) Opioid effects on ⁴⁵Ca²⁺ uptake and glutamate release in rat cerebral cortex in primary culture. *J. Neurochem.*, **68**, 517–524.
- Vuillet, J., Kerkerian, L., Kachidian, P., Bosler, O. & Nieoullon, A. (1989) Ultrastructural correlates of functional relationships between nigral dopaminergic or cortical afferent fibers and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum. *Neurosci. Lett.*, **100**, 99–104.
- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P. & Roques, B.P. (1987) Neutral endopeptidase-24.11, mu and delta opioid receptors after selective brain lesions: an autoradiographic study. *Brain Res.*, **436**, 205–216.
- Wang, H. & Pickel, V.M. (2001) Preferential cytoplasmic localization of delta-opioid receptors in rat striatal patches: comparison with plasmalemmal mu-opioid receptors. *J. Neurosci.*, **21**, 3242–3250.
- Wang, J.K. (1991) Presynaptic glutamate receptors modulate dopamine release from striatal synaptosomes. *J. Neurochem.*, **57**, 819–822.

- Warenycia, M.W., McKenzie, G.M., Murphy, M. & Szerb, J.C. (1987) The effects of cortical ablation on multiple unit activity in the striatum following dexamphetamine. *Neuropharmacology*, **26**, 1107–1114.
- Werling, L.L., Frattali, A., Portoghese, P.S., Takemori, A.E. & Cox, B.M. (1988) Kappa receptor regulation of dopamine release from striatum and cortex of rats and guinea pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **246**, 282–286.
- Westerink, B.H., Tuntler, J., Damsma, G., Rollema, H. & de Vries, J.B. (1987) The use of tetrodotoxin for the characterization of drug-enhanced dopamine release in conscious rats studied by brain dialysis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **336**, 502–507.
- Westerink, B.H., Hofsteede, R.M., Tuntler, J. & De Vries, J.B. (1989) Use of calcium antagonism for the characterization of drug-evoked dopamine release from the brain of conscious rats determined by microdialysis. *J. Neurochem.*, **52**, 722–729.
- Young, A.M. & Bradford, H.F. (1986) Excitatory amino acid neurotransmitters in the corticostriate pathway: studies using intracerebral microdialysis in vivo. *J. Neurochem.*, **47**, 1399–1404.

ARTICLE IN PRESS

Please cite this article in press as: Billet F, et al., Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal δ -opioid receptors, *Neuroscience* (2007), doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.004

Neuroscience xx (2007) xxx

INFLUENCE OF GLIAL CELLS IN THE DOPAMINE RELEASING EFFECT RESULTING FROM THE STIMULATION OF STRIATAL δ -OPIOID RECEPTORS

F. BILLET, J. COSTENTIN AND N. DOURMAP*

Unité de Neuropsychopharmacologie Expérimentale, F.R.E. 2735 C.N.R.S., Institut Hospitalo-Universitaire de Recherche Biomédicale, I.F.R.M.P. n°23, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rouen, 22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen cedex 01, France

Abstract—Recent data indicate that striatal dopamine release induced by stimulation of δ -opioid receptors is a consequence of glutamate release. However, glial cells, which mainly support glutamate uptake and are involved in glutamate signaling and potentially express δ -opioid receptors, could participate to this effect. The present study investigates the contribution of glial cells in the releasing effects of [D-Pen2, D-Pen5]-enkephalin (DPDPE) by using the gliotoxin L- α -aminoadipate (L- α AA). Initially, we evaluated the early influence of L- α AA local infusion (10 μ g/ μ L) on dialysate levels of glutamate and dopamine under basal or DPDPE treatment conditions. L- α AA produced a significant increase of glutamate and dopamine in dialysates (+76% and +50% respectively) and the concomitant infusion of DPDPE (10 μ M) significantly enhanced this effect in an additive manner (+110% and +44% respectively). Secondly, we assessed the DPDPE effects on striatal glutamate and dopamine dialysate levels, 2 days after an intra-striatal injection of L- α AA which produced destruction of glial cells. This lesion, decreasing the basal glutamate dialysate level as well as its tissue content (by 55% and 36% respectively), prevented the increase in glutamate and dopamine extracellular levels induced by DPDPE. This result confirmed that the DPDPE-induced dopamine release requires an initial glutamate release. However, this effect could reflect a major disruption of glutamatergic transmission caused by the toxin, as suggested by the local infusion of glutamine (2.5 mM) which, in lesioned rats, prevented the decrease in the basal extracellular content of glutamate and restored the DPDPE-induced increase in glutamate and dopamine dialysate levels. Therefore, these results indicate that, although glial cells are essential to maintain functional glutamatergic neurotransmission, they are not directly involved in the process by which stimulation of striatal δ -opioid receptors induces extracellular glutamate release and, consecutively, dopamine release. © 2007 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: microdialysis, DPDPE, glutamate release, striatum, gliotoxin, L- α -aminoadipate.

*Corresponding author: Tel: +33-235-14-86-02; fax: +33-235-14-86-03.

E-mail address: nathalie.dourmap@univ-rouen.fr (N. Dourmap).

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; A/P, antero-posterior; AUC, area under the curve; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; DPDPE, [D-Pen2, D-Pen5]-enkephalin; D/V, deep vertical; GMH, L-glutamyl γ -hydroxamate; GS, glutamine synthetase; HPLC, high-performance liquid chromatography; L- α AA, L- α -aminoadipate; M/L, medio-lateral; TTX, tetrodotoxin; X_c, cystine–glutamate exchanger.

0306-4522/07/\$30.00+0.00 © 2007 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2007.09.004

We recently reported that corticostriatal deafferentation prevented the increase in striatal dopamine release induced by DPDPE, the δ -opioid receptor agonist [D-Pen2, D-Pen5]-enkephalin (Billet et al., 2004). This result suggested that the stimulation of striatal δ -opioid receptors initially induces glutamate release from corticostriatal afferents that subsequently elicits dopamine release from nigrostriatal terminals. However, no direct synaptic contact between corticostriatal and nigrostriatal terminals has been observed in the striatum. Furthermore, glutamatergic synapses are closely encased in a sheath of glial cells and, although once considered simply as glue between neurons, it is now commonly accepted that this third cellular component plays an important role in synaptogenesis, synaptic plasticity and regulates glutamate uptake (Araque et al., 1998; Ullian et al., 2001; Bowers and Kalivas, 2003; Slezak and Pfriederger, 2003). Moreover, astrocytes contribute to the homeostasis of glutamate via the glutamate–glutamine cycle which involves uptake of glutamate into astrocytes, its conversion into glutamine and the subsequent efflux of glutamine from astrocytes into glutamatergic terminals, as a precursor for the neuronal glutamate synthesis. In addition to these acknowledged functions, recent data indicate that glial cells could participate in neurotransmission, especially concerning glutamate signaling. Indeed, it has been demonstrated that glial cells can relay the glutamate signal: through activation of ionotropic glutamate receptors (Clark and Barbour, 1997; Seifert et al., 1997; Matsui et al., 2005; Lalo et al., 2006), activation of metabotropic glutamate receptors leading to intracellular calcium release (Grosche et al., 1999; Kirischuk et al., 1999) or activation of glutamate transporters, which produce into astrocytes an ionic current induced by the synergistic influx of glutamate and sodium (Huang et al., 2004; Marcaggi and Attwell, 2004; Wallraff et al., 2004). Furthermore, glial cells are able to release glutamate via various mechanisms including, for example, reversal uptake operated by glutamate transporters (Szatkowski et al., 1990), Ca²⁺-dependent exocytosis (Parpura et al., 1994), efflux via the cystine/glutamate exchanger (Warr et al., 1999). Finally, although it was weakly observed *ex vivo* (Wang and Pickel, 2001), some *in vitro* studies performed on tissue cultures reported that glial cells could express δ -opioid receptors (Eriksson et al., 1990; Ruzicka et al., 1995). Taken together, these data are therefore not incompatible with the notion that astrocytes could play a role in the DPDPE-induced glutamate release and the subsequent dopamine release.

As astrocytes and neurons express many of the same receptors and second messenger signaling cascades, the use of pharmacological approaches to selectively block glial activity is limited due to the availability of specific tools. L- α -Amino adipate (L- α AA) is the best-described gliotoxin in the field of neuroscience. It has been reported to be a selective toxin for glial cells over three decades when Olney et al. (1971) showed that injection of the racemic mixture induced transient degenerative changes in non-neuronal cells, without any modification in the morphological integrity of the surrounding neurones. Numerous studies have then unambiguously demonstrated the specific effect of this six-carbon analog of glutamate on the viability of glial cells, either *in vivo* or *in vitro* (Pedersen and Karlsen, 1979; Olney et al., 1980; Huck et al., 1984; Takada and Hattori, 1986; McBean, 1990; Bridges et al., 1992; Khurgel et al., 1996; Brown and Kretzschmar, 1998; Nishimura et al., 2000; Pow, 2001).

The aim of the present study was to investigate the contribution of glial cells in the DPDPE-induced increase in striatal glutamate and dopamine releases. For this purpose, dialysate levels of glutamate and dopamine were measured in the striata of rats which were exposed to L- α AA, with two distinct methodologies. Firstly, L- α AA was directly infused into the striatum during microdialysis experiments, in order to evaluate the early effects induced by the gliotoxin. Secondly, dialysate levels of glutamate and dopamine were measured in striata of rats submitted, 2 days before, to an injection of L- α AA, in order to cause maximal damage to glial cells (lesional model).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

The experiments were performed on male Sprague–Dawley rats (250–300 g, Charles River, Saint-Aubin-lès-Elbeuf, France). They were maintained on a 12-h light/dark cycle, at a room temperature of 22 °C, under constant ventilation; they had access to food and water *ad libitum*. All animal manipulations were performed according to recommendations of the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), particularly for “cerebral microdialysis in awake animal” and “cerebral lesions produced by local injections of gliotoxins in the rat” protocols that were both approved by the Regional Ethical Committee (N/03-06-06/06 and N/04-06-07/07 respectively). All efforts were made to reduce the number of animals used in this study and to insure them optimal conditions of well-being, before, during and after each experiment.

Surgery

Animals were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, *i.p.*) and were placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). The skull was exposed and a hole was drilled to allow the 5 μ L-infusion of L- α -amino adipate (40 μ g/ μ L) or its solvent in the right striatum antero-posterior (A/P): +0.5 mm, medio-lateral (M/L): –3.0 mm, deep vertical (D/V): –5.0 mm relative to dura and bregma, according to Paxinos and Watson, (1986) at the flow rate of 0.5 μ L/min. For microdialysis experiments, a guide cannula (Carnegie Medicin, Sweden) was implanted in the ipsilateral striatum (A/P, +0.5 mm; M/L, –3.0 mm; D/V, 3.5 mm; relative to dura and bregma, according to Paxinos and Watson, 1986) and fixed with two stainless steel screws and

dental acrylic resin (Texton, SS White, Gloucester, UK; Dentsply, Hanau, Germany). The animals, individually housed, were allowed to recover from surgery for 2 days prior to following experiments.

Microdialysis experiments

Two days after surgery, a probe (membrane: length=3 mm; outer diameter=0.24 mm; dialysance, evaluated with known concentrations of glutamate and dopamine, in the range of 10–15%; CMA, Newton, Sweden) was inserted into the guide cannula, connected to a micropump (CMA/100, CMA) and perfused with Ringer's solution (in mM: NaCl 145; KCl 2.7; CaCl₂ 1.2 and MgCl₂ 1; pH 7.4) at a flow rate of 1.0 μ L/min. The animals, placed in a Plexiglas bowl, were free to move. After a 2-h equilibration period, successive 20 μ L samples were collected in vials containing 10 μ L of iced perchloric acid 0.1 M and cysteine 1 g/L in order to prevent their enzymatic and oxidative degradation respectively; they were stored at –80 °C, until assayed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The dead volume of catheter, between the probe and the collection vials, was 10 μ L; thus glutamate and dopamine concentration measurements were delayed by 10 min relatively to considered events. The first three samples were used to determine the basal release; then treatment (DPDPE 10 μ M alone; L- α -amino adipate 10 μ g/ μ L alone; or L- α -amino adipate 10 μ g/ μ L + DPDPE 10 μ M) was added to the perfusion medium for 20 min and the four successive samples were collected. In experiments performed to test the effects of a glutamine restoration, glutamine (2.5 mM) was added to the perfusion medium from the onset of the equilibration period to the last collected dialysate (160 min). This 2.5 mM concentration of glutamine was chosen to reproduce the basal extracellular level of glutamine that was evaluated at about 200 μ M from basal dialysate concentrations of glutamine reported in other striatal microdialysis studies (Segovia and Mora, 1998; Behrens et al., 2002; Molchanova et al., 2004), taking into account the dialysis factor of the probes (approximately 10%) in both cases. The probe position into striatum was checked during the dissection by macroscopic observation.

Preparation of brain tissues for neurotransmitter content determination

At the end of dialysis experiments, animals were killed by decapitation; brains were quickly removed and whole striata were dissected on ice (Glowinski and Iversen, 1966); they were homogenized by sonication at high frequency (70 Hz), for 4 s, using a Vibra Cell Sonicator (Sonics and Materials, Newton, CT, USA), in ice-cold perchloric acid 0.1 mol/L, containing 1 g/L cysteine. Homogenates were centrifuged (10,000 \times g, 10 min) and the supernatants were filtered by pressure through 0.45- μ m filters (Millipore, Billerica, MA, USA) before glutamate or dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) determinations. The pellets were resuspended in NaOH 0.1 M and used for protein determination according to the method of Lowry et al. (1951).

Determination of dopamine and DOPAC contents

Levels of dopamine and DOPAC were determined using a reverse-phase ion-pair HPLC system with electrochemical detection. The HPLC system consisted of a pump (LC200, Perkin Elmer, Waltham, CT, USA) connected to a C18 reversed phase column (2.0 \times 250 mm, 5 μ m, Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) coupled with an electrochemical detector (Decade, Antec Leyden, Netherlands) with a glassy carbon electrode set at 0.8 V vs. Ag/AgCl reference electrode. The mobile phase consisted of KH₂PO₄ 55 mM, methanol 64 mL/L, Pic B7 (Waters, Milford, MA, USA) 23.5 mL/L and Na₂EDTA 0.150 mM at pH 3.55; it was filtered through 0.45- μ m cellulose acetate filters (Millipore) and

ARTICLE IN PRESS

F. Billet et al. / Neuroscience xx (2007) xxx

3

delivered at a 0.3 mL/min flow rate. Twenty-microliter samples were injected into the HPLC system by means of an automatic device (AS 300, Spectra Physics, San Jose, CA, USA). Chromatograms were recorded and integrated by PC integration Borwin software (JMBS Developments, Le Fontanil, France). The detection limit at a signal-to-noise ratio of three was less than 5 fmol/ μ L.

Determination of glutamate contents

Levels of glutamate were determined by a HPLC system, using a prior derivatization at 4 °C, by adding 15 μ L of sample to the same volume of reactive solution prepared with *o*-phthalaldehyde 40 mM in a 0.4 M borate buffer (pH 10.4) containing ethanol 100 g/L and 2-mercaptoethanol 4 g/L. The 100-s derivatization was followed by separation and detection using an HPLC system with electrochemical detection. A C18 reversed phase column (2.0 \times 250 mm, 5 μ m, Beckman) was coupled with an electrochemical detector (Decade; Antec, Leyden, Netherlands), with a glassy carbon electrode set at 0.6 V vs. Ag/AgCl reference electrode. The mobile phase consisted of Na₂HPO₄ 0.1 M, methanol 270 mL/L and Na₂EDTA 0.150 mM (pH 6). It was filtered through 0.45- μ m cellulose acetate filters (Millipore) and delivered by a pump (LC200, Perkin Elmer) at a 0.3 mL/min flow rate. Then, 20 μ L samples were injected into the HPLC system by means of an automatic device (AS 300, Spectra Physics). Chromatograms were recorded and integrated using PC integration Borwin software (JMBS Developments). The detection limit at a signal-to-noise ratio of 3 was less than 5 pmol/ μ L.

Determination of glutamine synthetase (GS) activity

The activity of GS was measured, using a technique adapted from Rowe et al. (1970). Whole striata were homogenized at high frequency (70 Hz) for 4 s using a Vibra Cell Sonicator (Sonic and Materials) in five volumes of ice-cold imidazol buffer (0.1 M) containing 5 mM of cysteine (pH 7.2). Homogenates were centrifuged at 4 °C for 10 min at 10,000 \times g. Then, 100 μ L of the resulting supernatant was incubated for 15 min at 37 °C in incubation buffer consisting of 100 mM imidazol, 50 mM L-glutamate, 20 mM ATP, 10 mM β -mercaptoethanol, 40 mM MgCl₂ and 100 mM hydroxylamine (pH 7.2, final volume 0.5 mL). The reaction was stopped by the addition of 750 μ L of ferric solution containing FeCl₃ 0.37 M, HCl 0.67 M and trichloroacetic acid (TCA) 0.2 M. The resulting mixture was centrifuged at 4 °C for 10 min at 10,000 \times g and the absorbance of the supernatant was read at 535 nm. The absorbance values were compared with a standard curve of L-glutamyl γ -hydroxamate (GMH). The GS activity was expressed as nmol GMH/mg protein/min.

Measure of synaptosomal glutamate and dopamine uptake

Animals were killed by decapitation, brains were quickly removed and the whole striata were dissected on ice according to Glowinski and Iversen (1966) and homogenized in 20 volumes of saccharose 0.32 M, at 4 °C, using a Potter-Elvehjem (clearance 80–130 mm). The homogenate was centrifuged (1000 \times g, 10 min) at 4 °C and the pellet discarded. The supernatant was used as a crude synaptosomal preparation. Aliquots of the preparation (50 μ L) were preincubated at 37 °C for 5 min in Krebs-Ringer medium (final volume=1 mL) (in mM: NaCl 109; CaCl₂ 1; KH₂PO₄ 1.1; NaHCO₃ 27; glucose 5.4; pH 7.4). In dopamine uptake experiments, 10 μ L of a solution containing [³H]-dopamine (specific activity 6.6 Ci/mmol; final concentration 20 nM) and pargyline, a monoamine oxidase inhibitor (final concentration 100 μ M) was added to the synaptosomal preparation for a 5-min incubation period. In glutamate uptake experiments, the 10 μ L-solution contained L-[G-³H]-glutamic acid (specific activity 49.0 Ci/mmol; final concentration 4 nM) and 3-mercaptopyruvic acid, a glutamic

acid decarboxylase (GAD) inhibitor (final concentration 10 μ M). The reaction was stopped by dilution with 2 mL of ice-cold incubation buffer and centrifugation (3000 \times g, 10 min) at 4 °C. The pellet was washed and recentrifuged. Then, it was resuspended in distilled water and aliquots of the suspension were used for the determination of radioactivity by liquid scintillation and for the determination of protein concentration according to Lowry et al. (1951). The specific uptake of dopamine and glutamate was defined as the difference between the total uptake at 37 °C and the non-specific accumulation at 0 °C.

Drugs

DPDPE, L- α -amino acidipate and glutamine purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France), were dissolved in Ringer's solution and the pH was adjusted at 7.4. [³H]-L-glutamate and [³H]-dopamine were provided from Amersham (Buckinghamshire, UK).

Statistical analysis

Microdialysis data were expressed as % of basal values evaluated on the first three samples and statistical analyses were performed on these data (average of basal glutamate or dopamine content was also expressed in each group as concentrations). The effects of treatments on glutamate and dopamine dialysate levels were evaluated by using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's tests. The effects of treatments on striatal concentrations of glutamate, dopamine and DOPAC, on synaptosomal uptake of either dopamine or glutamate and on GS activity were evaluated by using an ANOVA or a Student's *t*-test. Statistical analyses were performed both with SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Statview (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) software and the probability was considered as significant for *P*<0.05.

RESULTS

Early effects induced by L- α AA on striatal neurochemical parameters

The *in vitro* addition of L- α AA into the incubation medium surrounding striatal cellular extracts reduced the GS activity in comparison with control value, at the concentrations of 5 mM (respectively 13.1 \pm 0.8 nmol/mg protein/min vs. 16.8 \pm 0.7 nmol/mg protein/min; -22.4% ; $t=3.494$; $P=0.002$; $n=12$) or 10 mM (respectively 9.8 \pm 0.7 nmol/mg protein/min vs. 16.9 \pm 0.7 nmol/mg protein/min; -41.8% ; $t=6.882$; $P<0.001$; $n=12$). Similarly, the addition of L- α AA (500 μ M) into the incubation medium of striatal synaptosomes reduced the glutamate uptake as compared with controls (respectively 1.26 \pm 0.05 pmol/mg protein vs. 0.72 \pm 0.03 pmol/mg protein; -42.4% ; $t=8.785$; $P<0.001$; $n=12$). However, as summarized in Table 1, 2 h after the *in vivo* infusion, through the dialysis probe, of L- α AA into the striatum (200 μ g over 20 min), no modification of GS activity was observed in the whole structure as compared with the contralateral striatum (16.8 \pm 0.7 nmol/mg protein/min vs. 16.2 \pm 1.1 nmol/mg protein/min; $t=-0.587$; $P>0.05$; $n=20$) or to control animals (16.8 \pm 0.7 nmol/mg protein/min vs. 16.6 \pm 1.5 nmol/mg protein/min; $t=0.0982$; $P>0.05$; $n=20$). Furthermore, the tissue content of glutamate measured from the whole striatum was unaffected by this treatment, in comparison with that measured in the contralateral striatum (53.6 \pm 6.8 nmol/mg protein vs. 54.3 \pm 5.4 nmol/mg protein; $t=0.233$; $P>0.05$; $n=12$) or with that in the ipsilat-

Please cite this article in press as: Billet F, et al., Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal δ -opioid receptors, Neuroscience (2007), doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.004

Table 1. Early effects induced by L- α AA infusion on neurochemical parameters in the striatum of rat

	Control, ipsilateral	L- α AA		P	
		Contralateral	Ipsilateral	(a) ^a	(b) ^b
GS activity (nmol/mg protein/min)	16.6 \pm 1.5	16.2 \pm 1.1	16.8 \pm 0.7	NS	NS
Glutamate content (nmol/mg protein)	57.3 \pm 6.8	54.3 \pm 5.4	53.6 \pm 6.8	NS	NS
Dopamine content (nmol/mg protein)	2.7 \pm 0.3	2.5 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3	NS	NS
DOPAC content (nmol/mg protein)	3.2 \pm 0.5	3.1 \pm 0.6	2.8 \pm 0.4	NS	NS

Neurochemical parameters were measured in the whole striatum, 2 h after the intra-striatal infusion of 200 μ g of L- α AA through the microdialysis probe. Each parameter was measured into the ipsilateral and contralateral striatum of L- α AA-injected animals and in the ipsilateral striatum of control rats. Means \pm S.E.M. were compared using Student's *t*-tests ($n=9$ or 12). NS, not significant.

^a (a) vs. ipsilateral side of control animals.

^b (b) vs. contralateral side of L- α AA-injected animals.

eral striatum of control rats (53.6 \pm 6.8 nmol/mg protein vs. 57.3 \pm 6.8 nmol/mg protein; $t=-0.378$; $P>0.05$; $n=12$). Likewise, the tissue content of glutamate in the contralateral striatum of control animal was unaltered in comparison with that measured in the dialyzed side (respectively 57.0 \pm 6.2 nmol/mg protein vs. 57.3 \pm 6.8 nmol/mg protein; $t=-0.0863$; $P=0.933$; $n=12$). Moreover, striatal tissue content of dopamine remained stable as compared with the opposite hemisphere (2.6 \pm 0.3 nmol/mg protein vs. 2.5 \pm 0.3 nmol/mg protein; $t=-0.167$; $P>0.05$; $n=12$) or to untreated animals (2.6 \pm 0.3 nmol/mg protein vs. 2.7 \pm 0.3 nmol/mg protein; $t=-0.386$; $P>0.05$; $n=12$). Finally, the DOPAC level was 2.8 \pm 0.4 nmol/mg protein in the striatum contralateral to L- α AA infusion vs. 3.1 \pm 0.6 nmol/mg protein in the ipsilateral striatum ($t=1.039$; $P>0.05$; $n=12$) while the content in the ipsilateral striatum of control rats was 3.2 \pm 0.5 nmol/mg protein ($t=-0.604$; $P>0.05$; $n=12$).

Effect of an intrastriatal co-infusion of DPDPE and L- α AA on the striatal glutamate dialysate level

Levels of glutamate under basal conditions, evaluated from the first three collected dialysates, were stable in each group prior to the intrastriatal infusion of DPDPE (Fig. 1). Moreover, it did not differ between groups and, when combined, was 22.8 \pm 3.0 pmol/min ($n=32$).

Three-factor ANOVA was carried out from data expressed as % of basal glutamate dialysate levels, with [L- α AA treatment], [DPDPE treatment] and [time] as factors. It indicated interactions between [DPDPE treatment] \times [time] ($F(7,255)=4.221$; $P<0.001$) and [L- α AA treatment] \times [time] ($F(7,255)=6.633$; $P<0.001$) but failed to reveal any interaction between DPDPE and L- α AA treatments ($F(1,255)=0.595$; $P=0.441$). Specifically, the local infusion of either DPDPE (10 μ M) or L- α AA (200 μ g) into the striatum, over a 20 min period, significantly increased the glutamate level in respectively the two or three samples following the onset of treatment. The glutamate dialysate level was increased by 53.0% ($P=0.012$; $n=8$) 20 min after L- α AA treatment and by 75.6% ($P<0.001$; $n=8$) 40 min later while DPDPE enhanced glutamate levels by 60.8% ($P<0.001$; $n=8$) 20 min after its infusion. The glutamate concentration in dialysates returned to baseline after 60–80 min. When

DPDPE was co-infused with L- α AA, an additive effect was observed on dialysate levels of glutamate which, 20 min after the onset of treatment, reached +82.0% ($P<0.001$; $n=8$) and, 40 min later, +186.0% ($P<0.001$; $n=8$) (Fig. 1). Two-way ANOVA, performed on AUC (area under the curve), failed to reveal [L- α AA treatment] \times [DPDPE treat-

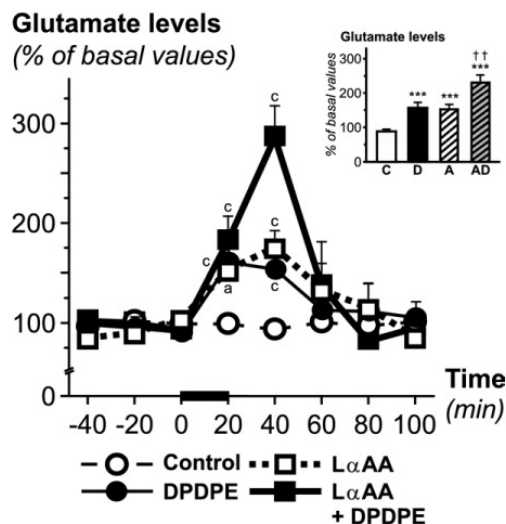


Fig. 1. Effects of DPDPE and L- α AA on glutamate striatal dialysate levels. After a 2-h equilibration period, successive 20 μ L microdialysis samples were collected and analyzed by HPLC with electrochemical detection to determine their glutamate content. The first three samples, used to determine the basal release of glutamate, were followed by the infusion of DPDPE (10 μ M), L- α AA (10 μ g/ μ L) or by the co-infusion of DPDPE (10 μ M) and L- α AA (10 μ g/ μ L) for 20 min (thickened abscissa segment) at the flow rate of 1.0 μ L/min. The basal glutamate level in dialysates, measured during the collection of the first three samples, was 22.8 \pm 3.0 pmol/min ($n=32$). Data are expressed in percentages of basal glutamate concentration in dialysates. Means \pm S.E.M. of eight rats per group were compared using a two-way repeated measures ANOVA followed by a Tukey's test. (a) $P<0.05$, (c) $P<0.001$ vs. control group ($n=8$). Inset figure shows the mean glutamate release evaluated during the 60 min following the perfusion of Ringer's solution in control (C) or L- α AA-treated (A) animals and in DPDPE-treated (D) or L- α AA+DPDPE-treated (AD) rats. *** $P<0.001$ vs. control group, ** $P<0.01$ vs. DPDPE group ($n=8$).

ARTICLE IN PRESS

F. Billet et al. / Neuroscience xx (2007) xxx

5

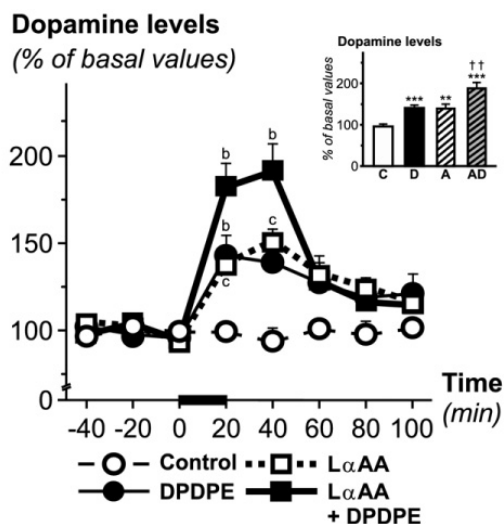


Fig. 2. Effects of DPDPE and L- α AA on dopamine striatal dialysate levels. After a 2-h equilibration period, successive 20 μ L microdialysis samples were collected and analyzed by HPLC with electrochemical detection to determine their dopamine content. The first three samples, used to determine the basal release of dopamine, were followed by the infusion of DPDPE (10 μ M), L- α AA (10 μ g/ μ L) or by the co-infusion of DPDPE (10 μ M) and L- α AA (10 μ g/ μ L) for 20 min (thickened abscissa segment) at the flow rate of 1.0 μ L/min. The basal dopamine level in dialysates, measured during the collection of the first three samples, was 46.1 ± 6.7 fmol/min ($n=32$). Data are expressed in percentages of basal glutamate concentration in dialysates. Means \pm S.E.M. of eight rats per group were compared using a two-way repeated measures ANOVA followed by a Tukey's test. (b) $P < 0.01$, (c) $P < 0.001$ vs. control group ($n=8$). Inset figure shows the mean dopamine release evaluated during the 60 min following the perfusion of Ringer's solution in control (C) or L- α AA-treated (A) animals and in DPDPE-treated (D) or L- α AA+DPDPE-treated (AD) rats. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control group, †† $P < 0.01$ vs. DPDPE group ($n=8$).

ment] interaction ($F(1,31)=0.158$; $P > 0.05$; $n=8$), confirming that both treatments produced additive effects on glutamate dialysate levels.

Effect of an intrastriatal co-infusion of DPDPE and L- α AA on the striatal dopamine dialysate level

Under basal conditions, dialysate levels of dopamine, evaluated from the first three collected dialysates, were stable in each group before the intrastriatal infusion of DPDPE (Fig. 2). Moreover, it did not differ between groups. When combined, it was 46.1 ± 6.7 fmol/min ($n=32$).

Three-factor ANOVA was carried out from data expressed as % of basal dopamine dialysate levels, with [L- α AA treatment], [DPDPE treatment] and [time] as factors. It demonstrated interactions between [DPDPE treatment] \times [time] ($F(7,255)=6.421$; $P < 0.001$) and [L- α AA treatment] \times [time] ($F(7,255)=7.459$; $P < 0.001$). Specifically, the local infusion of either DPDPE (10 μ M) or L- α AA (200 μ g) into the striatum over a 20 min period significantly increased the dopamine level in respectively the two or three samples following the onset of treatment. The dopamine dialysate level was increased by 37.0% ($P=0.001$; $n=8$) and, 40 min later, by 50.3% ($P=0.001$; $n=8$) after the treatment with L- α AA and by 42.8% ($P=0.008$; $n=8$) 20 min after the infusion of DPDPE. The dopamine concentration in dialysates returned to baseline after 60–80 min. When DPDPE was co-infused with L- α AA, an additive effect was observed on dopamine dialysate levels which, 20 min after the onset of treatment, reached +84.8% ($P=0.005$; $n=8$) and, 40 min later, +94.2% ($P=0.011$; $n=8$) (Fig. 2).

Two-way ANOVA, performed on AUC, failed to reveal [L- α AA treatment] \times [DPDPE treatment] interaction ($F(1,31)=0.0179$; $P > 0.05$), confirming that both treatments produced additive effects on dopamine dialysate levels.

Late effects induced by L- α AA on striatal neurochemical parameters, 2 days after its administration

As summarized in Table 2, the *in vivo* injection of L- α AA (200 μ g in 5 μ L) into the right striatum induced 2 days later a significant reduction in GS activity in the whole striatum as compared with the contralateral side (13.3 ± 0.6 nmol/

Table 2. Effects observed 2 days after striatal infusion of L- α AA on neurochemical parameters in the striatum of rat

	Control, ipsilateral	L- α AA-lesioned rats		<i>P</i>	
		Contralateral	Ipsilateral	(a) ^a	(b) ^b
GS activity (nmol/mg protein/min)	16.9 ± 0.7	17.2 ± 0.7	13.3 ± 0.6	(-21.3%)***	(-22.7%)***
Glutamate content (nmol/mg protein)	57.3 ± 6.8	54.2 ± 6.0	34.6 ± 4.6	(-39.6%)*	(-36.2%)***
Glutamate uptake (pmol/mg protein)	1.27 ± 0.07	1.26 ± 0.03	0.87 ± 0.04	(-31.5%)***	(-31.0%)***
Dopamine content (nmol/mg protein)	2.7 ± 0.3	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.3	NS	NS
DOPAC content (nmol/mg protein)	3.2 ± 0.5	2.8 ± 0.7	2.8 ± 0.4	NS	NS
Dopamine uptake (pmol/mg protein)	4.9 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.3	NS	NS

Neurochemical parameters were measured in the whole striatum, 2 days after the lesion produced by intra-striatal injection of 200 μ g of L- α AA. Each parameter was measured into the ipsilateral and contralateral striatum of L- α AA-injected animals and in the ipsilateral striatum of control rats. Means \pm S.E.M. were compared using Student's *t*-tests ($n=9$ or 12). NS, not significant.

^a (a) vs. ipsilateral side of control animals.

^b (b) vs. contralateral side of L- α AA-injected animals.

* $P < 0.05$.

*** $P < 0.001$.

Please cite this article in press as: Billet F, et al., Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal δ -opioid receptors, Neuroscience (2007), doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.004

mg protein/min vs. 17.2 ± 0.7 nmol/mg protein/min; -22.7% ; $t=9.444$; $P<0.001$; $n=9$) or to the ipsilateral striatum of control animals (13.3 ± 0.6 nmol/mg protein/min vs. 16.9 ± 0.7 nmol/mg protein/min; -21.3% ; $t=-3.862$; $P=0.001$; $n=9$ and 12 respectively). This injection also induced a significant decrease in the striatal tissue content of glutamate measured in the whole structure as compared with the contralateral side (34.6 ± 4.6 nmol/mg protein vs. 54.2 ± 6.0 nmol/mg protein; -36.2% ; $t=6.937$; $P<0.001$; $n=12$) or to the ipsilateral striatum of control animals (34.6 ± 4.6 nmol/mg protein vs. 57.3 ± 6.8 nmol/mg protein; -39.6% ; $t=-2.778$; $P=0.011$; $n=12$). Similarly, the synaptosomal uptake of radiolabeled glutamate in the ipsilateral striatum of L- α AA-injected animals (0.87 ± 0.04 pmol/mg protein) was significantly reduced as compared with the contralateral striatum (1.26 ± 0.03 pmol/mg protein; -31.0% ; $t=7.054$; $P<0.001$; $n=9$) or in comparison with the ipsilateral striatum of control animals (1.27 ± 0.07 pmol/mg protein; -31.5% ; $t=-4.578$; $P<0.001$; $n=12$). However, the striatal content of dopamine in the ipsilateral striatum (2.5 ± 0.3 nmol/mg protein) was not modified as compared with the contralateral side (2.6 ± 0.3 nmol/mg protein; $t=0.754$; $P>0.05$; $n=12$) or in comparison with the ipsilateral striatum of control animals (2.7 ± 0.3 nmol/mg protein; $t=0.514$; $P>0.05$; $n=12$). The DOPAC level was 2.8 ± 0.4 nmol/mg protein in the striatum contralateral to L- α AA injection vs. 2.8 ± 0.7 nmol/mg protein in the ipsilateral striatum ($t=-0.310$; $P>0.05$; $n=12$), while the content in the ipsilateral of control rats was 3.2 ± 0.5 nmol/mg protein ($t=-0.600$; $P>0.05$; $n=12$). The synaptosomal [3 H]-dopamine uptake operated by synaptosomes prepared from the ipsilateral striatum (5.4 ± 0.3 pmol/mg protein) did not significantly differ from that measured on synaptosomes prepared from the contralateral striatum (5.2 ± 0.2 pmol/mg protein; $t=-0.818$; $P>0.05$; $n=9$) or from the ipsilateral striatum of control animals (4.9 ± 0.2 pmol/mg protein; $t=1.130$; $P>0.05$; $n=9$ or 12 respectively).

Effect of an intrastriatal infusion of DPDPE on the striatal glutamate dialysate level 2 days after L- α AA injection

The effect of DPDPE on glutamate dialysate levels was tested under two conditions, using either glutamine-enriched medium or a glutamine-free medium.

Glutamine-free medium

Levels of glutamate under basal conditions, evaluated from the first three collected dialysates, were stable in each group before the intrastriatal infusion of DPDPE (Fig. 3). However, 2 days after the injection of L- α AA into the striatum, the striatal dialysate levels of glutamate were greatly reduced as compared with sham-operated animals (10.2 ± 2.0 pmol/min vs. 22.8 ± 3.0 pmol/min; -55.2% ; $t=2.765$; $P=0.006$; $n=16$ and 32 respectively).

Three-factor ANOVA was carried out from data expressed as % of basal glutamate dialysate levels, with [L- α AA lesion], [DPDPE treatment] and [time] as factors. It demonstrated an interaction between [DPDPE treatment] and [L- α AA lesion] factors ($F(7,255)=7.564$; $P=0.006$).

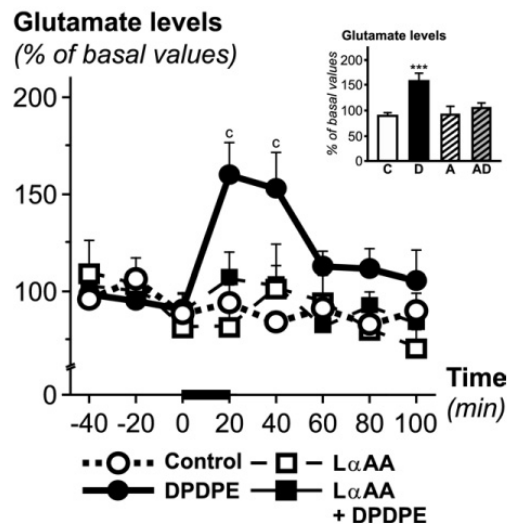


Fig. 3. Effect of DPDPE on glutamate dialysate levels in striatum of rats submitted 2 days before or not to the intra-striatal injection of L- α AA. Before implantation of a guide cannula into the right striatum, animals were submitted or not to the injection of L- α AA in the ipsilateral striatum ($200 \mu\text{g}$ in $5 \mu\text{L}$, $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$). Two days later, a microdialysis probe was inserted into the cannula and perfused with Ringer's solution at the flow rate of $1.0 \mu\text{L}/\text{min}$. After a 2-h equilibration period, successive $20 \mu\text{L}$ samples were collected and analyzed by HPLC with electrochemical detection to determine their glutamate content. The first three samples, used to determine the basal release of glutamate, were followed by the infusion of DPDPE ($10 \mu\text{M}$) for 20 min (thickened abscissa segment). The basal glutamate level in dialysates, measured during the collection of the first three samples, was 22.8 ± 3.0 pmol/min in control rats ($n=32$) vs. 10.2 ± 2.0 pmol/min in L- α AA-injected animals ($n=16$; $t=2.765$; $P=0.006$). Data are expressed in percentages of basal glutamate concentration in dialysates. Means \pm S.E.M. of eight rats per group were compared using a two-way ANOVA followed by a Tukey's test. (c) $P<0.001$ vs. control group ($n=8$). Inset figure shows the mean glutamate release evaluated during the 60 min following the perfusion of Ringer's solution in control (C) or L- α AA-lesioned (A) animals and in DPDPE-treated (D) or L- α AA+DPDPE-treated (AD) rats. *** $P<0.001$ vs. control group ($n=8$).

Specifically, two-way repeated measures ANOVA revealed that the 20 min infusion of DPDPE ($10 \mu\text{M}$) into the striatum of control rats produced a significant increase in extracellular glutamate level ([DPDPE treatment] \times [time]; $F(7,127)=2.57$; $P<0.001$) in the two samples following the onset of the DPDPE infusion whereas it was ineffective in the ipsilateral striatum of L- α AA-injected animals ([DPDPE treatment] \times [time]; $F(7,127)=0.863$; $P>0.05$). DPDPE increased the glutamate level in dialysate by 60.8% ($P<0.001$, $n=8$) 20 min after its injection in the striatum of unlesioned animals and the level returned to baseline after 60–80 min. The L- α AA lesion totally prevented the DPDPE-induced increase in glutamate dialysate levels locally measured in the striatum (Fig. 3).

Likewise, two-way ANOVA, performed on AUC, confirmed the significant interaction [L- α AA lesion] \times [DPDPE treatment] ($F(1,31)=4.932$; $P=0.035$) and indicated that the increase of extracellular glutamate levels induced by

ARTICLE IN PRESS

F. Billet et al. / Neuroscience xx (2007) xxx

7

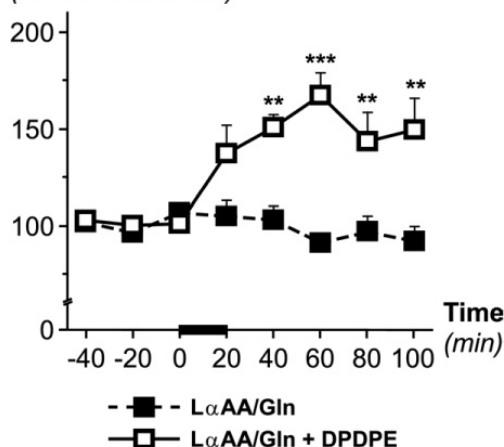
Glutamate levels
(% of basal values)

Fig. 4. Effect of DPDPE on glutamine-induced glutamate dialysate levels in striatum of rats submitted 2 days before to the intra-striatal injection of L- α AA. Before implantation of a guide cannula into the right striatum, animals were submitted to the injection of L- α AA in the ipsilateral striatum (200 μ g in 5 μ L, 0.5 μ L/min). Two days later, a microdialysis probe was inserted in the cannula and perfused with Ringer's solution containing 2.5 mM of glutamine, at the flow rate of 1.0 μ L/min. After a 2-h equilibration period, successive 20 μ L samples were collected and analyzed by HPLC with electrochemical detection to determine their glutamate content. The first three samples, used to determine the basal release of glutamate, were followed by the infusion of DPDPE (10 μ M) for 20 min (thickened abscissa segment). The basal glutamate level in dialysates, measured during the collection of the first three samples, was similar in both groups with a mean value of 197.7 \pm 12.0 pmol/min ($n=12$). Data are expressed in percentages of basal glutamate concentration in dialysates. Means \pm S.E.M. of six rats per group were compared using a two-way ANOVA followed by a Tukey's test. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. control group ($n=6$).

DPDPE (+76.6%; $P=0.003$; $n=8$; inset of Fig. 3) was abolished by L- α AA lesion.

Glutamine-enriched medium

The striatal infusion of glutamine (2.5 mM) from the onset of the equilibration period, increased basal glutamate levels in L- α AA-lesioned animals (185.0 \pm 13.2 pmol/min vs. 7.8 \pm 0.2 pmol/min; +2271.8%; $F(14,44)=16.228$; $P=0.001$; one way repeated measures ANOVA; $n=3$), which were stable in each group before the infusion of DPDPE (Fig. 4).

Two-way ANOVA, carried out from data expressed as % of basal glutamate dialysate levels, with [DPDPE treatment] and [time] as factors, demonstrated an interaction between [DPDPE treatment] and [time] factors ($F(7,95)=5.963$; $P < 0.001$). More specifically, it indicates that the 20 min infusion of DPDPE (10 μ M) into the striatum of animals perfused with glutamine (2.5 mM) and injected 2 days before with L- α AA produced, 40 min later, a significant increase in glutamate dialysate levels (+48.5%; $P < 0.01$; $n=6$) that was maximal after 60 min (+64.8%; $P < 0.001$; $n=6$) and persisted up to 100 min. The DPDPE effect on extracellular glutamate, prevented by the lesion with L- α AA,

was therefore restored by the infusion of a glutamine-enriched medium.

Effect of an intrastriatal infusion of DPDPE on the striatal dopamine dialysate level 2 days after L- α AA injection

The effect of DPDPE on dopamine dialysate levels was tested under conditions of glutamine-enriched or glutamine-free medium.

Glutamine-free medium

Under basal conditions, dialysate levels of dopamine, evaluated from the first three collected dialysates were stable in each group before the treatment with DPDPE (Fig. 5) and were not modified in the striatum of lesioned animals (46.1 \pm 6.7 fmol/min vs. 45.2 \pm 7.8 fmol/min, $t=1.310$; $P > 0.05$; $n=32$ and 16 respectively).

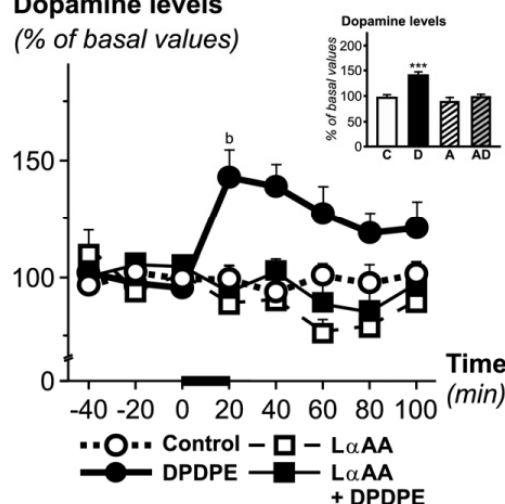
Dopamine levels
(% of basal values)

Fig. 5. Effect of DPDPE on dopamine dialysate levels in striatum of rats submitted 2 days before or not to the intra-striatal injection of L- α AA. Before implantation of a guide cannula in the right striatum, animals were submitted or not to the injection of L- α AA in the ipsilateral striatum (200 μ g in 5 μ L, 0.5 μ L/min). Two days later, a microdialysis probe was inserted in the cannula and perfused with Ringer's solution at the flow rate of 1.0 μ L/min. After a 2-h equilibration period, successive 20 μ L samples were collected and analyzed by HPLC with electrochemical detection to determine their dopamine content. The first three samples, used to determine the basal release of dopamine, were followed by the infusion of DPDPE (10 μ M) for 20 min (thickened abscissa segment). The basal dopamine level in dialysates, measured during the collection of the first three samples, was 46.1 \pm 6.7 fmol/min in control rats ($n=32$) vs. 45.2 \pm 7.8 fmol/min in L- α AA-injected animals ($n=16$; $t=0.0848$; $P=0.933$). Data are expressed in percentages of basal dopamine concentration in dialysates. Means \pm S.E.M. of eight rats per group were compared using a two-way ANOVA followed by a Tukey's test. (b) $P < 0.01$ vs. control group ($n=8$). Inset figure shows the mean dopamine release evaluated during the 60 min following the perfusion of Ringer's solution in control (C) or L- α AA-lesioned (A) animals and in DPDPE-treated (D) or L- α AA+DPDPE-treated (AD) rats. *** $P < 0.001$ vs. control group ($n=8$).

Please cite this article in press as: Billet F, et al., Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal δ -opioid receptors, Neuroscience (2007), doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.004

Three-factor ANOVA was performed on data expressed as % of basal dopamine dialysate levels, with [L- α AA lesion], [DPDPE treatment] and [time] as factors. It showed an interaction between [DPDPE treatment] and [L- α AA lesion] as factors ($F(1,255)=5.920$; $P=0.016$). Specifically, two-way repeated measures ANOVA revealed that 20 min infusion of DPDPE (10 μ M) produced a significant increase in dopamine level ([DPDPE treatment] \times [time]; $F(7,127)=3.645$; $P=0.002$) in the two samples following the outset of the striatal DPDPE treatment in control rats, whereas it was ineffective in the ipsilateral striatum of L- α AA-lesioned rats ([DPDPE treatment] \times [time]; $F(7,127)=0.745$; $P>0.05$). DPDPE increased the dialysate level of dopamine by 42.7% ($P<0.001$, $n=8$) 20 min after its infusion in the striatum of unlesioned animals and the level returned to baseline after 60–80 min. However, L- α AA led to an abolition of the DPDPE effect on dopamine release in the striatum of lesioned rats (Fig. 5).

Likewise, two-way ANOVA, performed on AUC, confirmed the significant interaction [L- α AA lesion] \times [DPDPE treatment] ($F(1,31)=7.238$; $P=0.012$) indicating that the increase of dopamine dialysate levels induced by DPDPE (+46.3%; $P<0.001$; $n=8$; inset of Fig. 4) was prevented by the L- α AA lesion.

Glutamine-enriched medium

The striatal infusion of glutamine (2.5 mM) from the onset of the equilibration period enhanced 60 min later basal dopamine levels in L- α AA-lesioned animals (96.2 ± 24.2 fmol/min vs. 47.0 ± 6.7 fmol/min; +104.8%; $F(14,44)=3.646$; $P=0.002$; one way repeated measures ANOVA; $n=3$). Dopamine dialysate levels returned to baseline after 100 min (50.3 ± 3.8 fmol/min vs. 47.0 ± 6.7 fmol/min; $P>0.05$; $n=3$) and were stable in each group before the infusion of DPDPE (Fig. 6).

Two-way ANOVA, carried out from data expressed as % of basal dopamine dialysate levels, with [DPDPE treatment] and [time] as factors, demonstrated an interaction between [DPDPE treatment] and [time] factors ($F(7,95)=2.567$; $P=0.019$). Specifically, it indicates that the 20 min infusion of DPDPE (10 μ M) into the striatum of animals perfused with glutamine (2.5 mM) and injected 2 days before with L- α AA produced, 40 min later, a significant increase in dopamine dialysate levels (+128.0%; $P<0.01$; $n=6$) that was maximal after 60 min (+219.8%; $P<0.001$; $n=6$). The DPDPE effect on extracellular dopamine, prevented by the lesion with L- α AA, was therefore restored by the infusion of a glutamine-enriched medium.

DISCUSSION

The present study investigated the effects of DPDPE, a selective agonist of δ -opioid receptors (for review see Quock et al., 1999), on glutamate and dopamine levels in striatal dialysates collected from rats exposed to the gliotoxin L- α AA. Striatal infusion of DPDPE locally increased both striatal glutamate and dopamine release of control rats, whereas it lost its effects in the striatum of rats submitted 2 days before to an intrastriatal injection of L- α AA.

Dopamine levels (% of basal values)

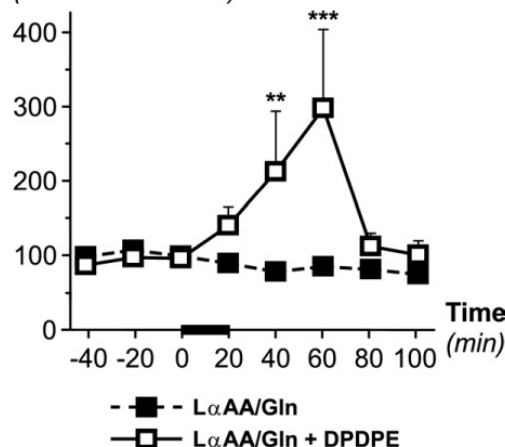


Fig. 6. Effect of DPDPE on glutamine-induced dopamine dialysate levels in striatum of rats submitted 2 days before to the intra-striatal injection of L- α AA. Before implantation of a guide cannula in the right striatum, animals were submitted to the injection of L- α AA in the ipsilateral striatum (200 μ g in 5 μ L, 0.5 μ L/min). Two days later, a microdialysis probe was inserted in the cannula and perfused with Ringer's solution containing 2.5 mM of glutamine, at the flow rate of 1.0 μ L/min. After a 2-h equilibration period, successive 20 μ L samples were collected and analyzed by HPLC with electrochemical detection to determine their dopamine content. The first three samples, used to determine the basal release of dopamine, were followed by the infusion of DPDPE (10 μ M) for 20 min (thickened abscissa segment). The basal dopamine level in dialysates, measured during the collection of the first three samples, was similar in both groups with a mean value of 48.7 ± 6.9 fmol/min ($n=12$). Data are expressed in percentages of basal glutamate concentration in dialysates. Means \pm S.E.M. of six rats per group were compared using a two-way ANOVA followed by a Tukey's test. ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ vs. control group ($n=6$).

However, the addition of glutamine to the perfusion medium restored the DPDPE-induced increase in extracellular glutamate and dopamine levels abolished by L- α AA at this later post-lesional time. In contrast, the stimulating effects of DPDPE on striatal dialysate levels of glutamate and dopamine persisted despite the concomitant infusion of L- α AA, which alone also produced an increase in glutamate and dopamine release into the striatum. These results confirm that glutamate is required for the DPDPE-induced dopamine release and allow us to specify that, although glial cells are essential to maintain functional glutamatergic neurotransmission, the signaling process by which stimulation of δ -opioid receptors increase extracellular glutamate does not directly involve glial sites.

Effects of L- α AA on neurochemical parameters in rat striatum

Glutamate uptake operated by striatal synaptosomes. In the present study, the addition of the gliotoxin L- α AA to the incubation medium of crude synaptosomal preparations, which contain many glial components (Nakamura et al., 1993), reduced the *in vitro* striatal uptake of glutamate.

ARTICLE IN PRESS

F. Billet et al. / Neuroscience xx (2007) xxx

9

This result is in agreement with previously reported studies showing that, at millimolar concentration, L- α AA is a substrate for the high-affinity sodium-dependent glutamate transporter (Pannicke et al., 1994; McBean, 1994; Tsai et al., 1996), recently suggested as the main access route for the gliotoxin to C6 glioma cells (Brennan et al., 2004). However, at micromolar concentration, L- α AA is also a substrate for the cystine–glutamate exchanger (Bannai, 1986; Kato et al., 1993; Tsai et al., 1996) that mediates the Na⁺-independent exchange of cystine into cells, coupled to the efflux of intracellular glutamate. Our experiments does not permit us to distinguish the activity of the cystine–glutamate exchanger (X_c⁻) from that of the high-affinity sodium-dependent glutamate transporter in the specific accumulation process of L- α AA into glial cells. However, the persistent decrease in synaptosomal glutamate uptake (approximately –30%) observed 2 days after the L- α AA injection probably reflects a loss of astrocytes since, in all likelihood, the gliotoxin had completely disappeared at this time. This interpretation is in agreement with the glial degeneration process pointed out by Khurgel et al. (1996) under similar conditions.

GS activity. Although the accumulation of L- α AA into astrocytes have been reported to induce lethal oxidative stress due to decreased glutathione synthesis (Harris, 1989; Kato et al., 1993), Brennan et al. (2004) suggested that the L- α AA toxicity could result from disruption of cellular metabolism in glial cells through enzymes and pathways involving glutamate, in particular GS which is exclusively localized in astrocytes (Hertz, 1979). Indeed, alterations in GS activity have been reported in numerous studies as a consequence of L- α AA application (Linser and Moscona, 1981; McBean, 1994; Kato et al., 1996). Due to the cellular specificity of GS, measurement of changes in GS activity constitutes, therefore, a useful biochemical index to evaluate the disruption of glial metabolism induced by L- α AA.

In the present study, GS activity was significantly reduced *in vitro* by the addition of L- α AA into the incubation medium, suggesting that the gliotoxic actions of L- α AA start early after its administration. *In vivo*, the striatal injection of L- α AA also produced a significant reduction in the GS activity measured 2 days later from the whole striatum (by approximately 20%). This result is in apparent discordance with the study of McBean (1990) showing that the striatal injection of the racemic mixture of α -aminoadipate (100 μ g) induced a significant reduction in GS activity at 6 but not 24 h after injection. However, in the present experiments, we used the most potent L isomer of α AA (Olney et al., 1980; Kato et al., 1996) at a higher dose (200 μ g), which produced a glial toxicity that was maximal at 48 h after its injection (Khurgel et al., 1996). The concomitant alterations of GS activity and synaptosomal glutamate uptake observed 2 days after L- α AA injection argue therefore in favor of an effective gliotoxicity of this compound under our experimental conditions. Contrary to the result obtained at 2 days, L- α AA had no effect on the GS activity measured from the whole striatum 2 h after its infusion

through the dialysis probe, which could appear in contradiction with the early effect observed *in vitro*. However, considering the dialysance of the probe and the diffusion of the toxin in the brain tissue, which decreased according to the distance, it is probable that early effects induced *in vivo* by L- α AA were limited to the vicinity of the probe. In agreement with this interpretation, Khurgel et al. (1996) showed that the astrocytes damage consecutive to the intra-striatal injection of L- α AA was already evident 4 h later, as revealed by the increase in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity around the injection site. In conjunction with our *in vitro* experiments, this result suggests therefore that the initial disruption of glial metabolism occurs very early in the vicinity of the injection site while the measurement of a reduced GS activity in the whole striatum is probably delayed.

Striatal glutamate level. The striatal infusion of L- α AA resulted early in an increase in glutamate dialysate levels. As discussed in the first paragraph, the cystine–glutamate exchanger X_c⁻ and the high-affinity sodium-dependent glutamate transporter have been reported as the initial access points of the toxin into glial cells. Therefore, the increase in glutamate dialysate levels evidenced, in our experiments, during the early stages following L- α AA perfusion could reflect: either an action focusing on X_c⁻ and inducing a glutamate efflux that glutamate transporters could not contain; either an inhibition of glial glutamate uptake; or a conjunction of these two mechanisms. On the contrary, 2 days after the striatal injection of L- α AA, a significant decrease was observed in the tissue content of glutamate measured from the whole striatum (–40%) and in the basal extracellular levels of glutamate measured in the vicinity of the injection site (–55%). The concentration of glutamate measured from brain homogenates mainly reflects the cellular distribution of glutamate (Meldrum, 2000), which is in great favor of neurones since only 15% of the cellular glutamate appear present in glial cells (Fonnum, 1985). In conjunction with the concomitant decreased GS activity, the reduction by 40% of the glutamate tissue content measured from the whole striatum, which was likely larger near the injection site of the gliotoxin (where the dialysis probe was inserted), suggests a massive disruption of glial cells. It also suggests an alteration of neuronal pools of glutamate resulting from the glial lesion induced by L- α AA. As reported in numerous other microdialysis studies (for review: Timmerman and Westerink, 1997), basal dialysate levels of glutamate are insensitive to tetrodotoxin (TTX) and calcium depletion (Billet et al., 2004). These data suggest that, in basal conditions, the extracellular glutamate released from neurons by exocytosis is largely masked by non-vesicular release. Furthermore, Baker et al. (2002) recently reported that, in the striatum, the majority (about 60%) of basal extracellular glutamate depends on X_c⁻ which is preferentially located in glia (Cho and Bannai, 1990; Murphy et al., 1990). The strong reduction in basal glutamate dialysate levels observed in the present study (–55%) indicates therefore that, 2 days after its injection, L- α AA locally induced a massive disruption of

Please cite this article in press as: Billet F, et al., Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal δ -opioid receptors, Neuroscience (2007), doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.004

glial cells, as it was suggested by the significant inhibition of the GS activity measured in the whole striatum. Because of the crucial importance of glial cells for the biosynthesis of glutamine, the precursor required by glutamatergic neurons to replenish their neurotransmitter pools of glutamate (van den Berg and Garfinkel, 1971; Benjamin and Quastel, 1972; Berl and Clarke, 1983; Ottersen et al., 1992; Rae et al., 2003; Waagepetersen et al., 2005), it could also suggest a strong impairment of the glutamatergic transmission. In agreement with this interpretation, Rothstein and Tabakoff (1984) showed that the addition of glutamine to the perfusion medium completely reversed the inhibition of the calcium-dependent and potassium-stimulated glutamate release evoked from striatal slices by methionine sulfoximine, a GS inhibitor. Furthermore, Szerb and O'Regan (1985) reported the strong potentiation of glutamate release induced by glutamine, in a calcium-dependent and TTX-sensitive way. Likewise, blockage of the glutamine availability has recently been shown to decrease the neurotransmitter pool of glutamate that cannot be replaced by de novo synthesis (Rae et al., 2003). These results support the key role of glutamine in the preservation of the glutamatergic neurotransmission. Interestingly, in the present study, the addition of glutamine to the perfusion medium increased the glutamate extracellular levels that were switched off in lesioned rats to a scale higher than that observed in control rats. This was probably due to the L- α AA-induced local impairment of glial cells which become unable to ensure the glutamate uptake maintaining extracellular glutamate at low concentrations under normal conditions (Jabaudon et al., 1999).

Dopamine uptake and striatal dopamine level. Two days after the infusion of L- α AA, the dopamine uptake operated by synaptosomes prepared from the whole striatum was not modified. Dopamine uptake is considered as a reliable index of dopamine innervation since it is not affected by various pharmacological treatments modifying the DA transmission (Naudon et al., 1995). Furthermore, the striatal dopamine and DOPAC contents or the basal extracellular concentration of dopamine measured by microdialysis were not altered in early stages or 2 days after L- α AA treatment. Therefore, these results argue for a preservation of the functional integrity of nigro-striatal afferents and possibly their ability to release dopamine in response to extracellular glutamate. Moreover, this indicates that the dopamine release, although modulated by glutamate, could be maintained at the same level despite the disruption of glutamatergic transmission.

Effects of the intrastriatal co-infusion of DPDPE and L- α AA on the striatal dialysate levels of glutamate and dopamine

The present results confirm previous experiments (Dourmap et al., 1991; Matsumoto et al., 1994; Billet et al., 2004) showing that the selective δ -opioid receptor agonist DPDPE (Mosberg et al., 1983) increases both glutamate and dopamine dialysate levels in the striatum via δ -opioid receptors (Schad et al., 1996; Billet et al., 2004).

The local infusion of L- α AA into the striatum increased significantly, 20 min later, both glutamate and dopamine dialysate levels. As discussed previously, the increased glutamate dialysate levels resulting from L- α AA perfusion probably reflect the rapid involvement of astrocytes surrounding the dialysis probe, via activation of cystine–glutamate exchange and/or inhibition of glutamate uptake. As glutamate is able to stimulate dopamine release (Giorguieff-Chesselet et al., 1979; Westerink et al., 1989; Wang, 1991), the increased dopamine dialysate levels consecutive to the local infusion of L- α AA probably results from this increased glutamate dialysate levels. The concomitant infusion of L- α AA and DPDPE produced additive effects, with significant increase in glutamate and dopamine dialysate levels. This result suggests that the effect of DPDPE on glutamate release and its consequence on dopamine release are independent from an increase in extracellular glutamate involving glial sites early affected by L- α AA (i.e. cystine–glutamate exchanger and glutamate transporters), as previously confirmed, concerning glutamate transporters, by our experiments (Billet et al., 2004) using the glutamate uptake inhibitor L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (PDC).

Effects of an intrastriatal infusion of DPDPE on the striatal dialysate levels of glutamate and dopamine 2 days after L- α AA injection

The injection of L- α AA into the striatum prevented 2 days later the DPDPE-induced increase in glutamate and dopamine release. At first sight, these data could suggest a specific involvement of glial cells in the release of glutamate resulting from stimulation of striatal δ -opioid receptors and, consequently, in the release of dopamine. Some reported data of the literature appear in favor of this first hypothesis. At once, some studies performed on tissue cultures provided evidence that δ -opioid receptors could be expressed by glial cells (Eriksson et al., 1990; Ruzicka et al., 1995). Furthermore, stimulation of these δ -opioid receptors could mobilize intracellular free calcium, as shown *in vitro* (Thorlin et al., 1998). Moreover, glial cells contribute to neurotransmission, especially glutamate transmission for which they have been shown to fulfill reception of the signal (Clark and Barbour, 1997; Grosche et al., 1999; Huang et al., 2004) as well as its emission (Szatkowski et al., 1990; Parpura et al., 1994; Warr et al., 1999). However, the lack of DPDPE effect could also reflect an incapacity of glutamatergic neurons to maintain functional glutamate release 2 days after the L- α AA-induced lesion of glial cells. Several lines of evidence converge on this second hypothesis. First, the basal dialysate level of glutamate measured in the ipsilateral striatum of rats lesioned 2 days before with L- α AA, which was markedly reduced (–55%), indicates a massive destruction of glial cells. Since the supply of glutamatergic neurones with glutamine is essential to maintain glutamatergic transmission (Lieth et al., 2001; Sibson et al., 2001; Rae et al., 2003), this result also suggests a strong impairment of the glutamatergic transmission. The addition of glutamine to the perfusion medium, which restored the stimulating ef-

ARTICLE IN PRESS

F. Billet et al. / Neuroscience xx (2007) xxx

11

fect of DPDPE on glutamate dialysate levels that was abolished by the glial lesion produced by $L\text{-}\alpha\text{AA}$ at 2 days, therefore strongly suggests that glial cells are not directly involved in the DPDPE-induced glutamate release. However, we cannot exclude the eventuality that some intact glial cells (such as cells surviving to the lesion or resulting from potential inflammation), which can operate glutamine uptake, contain phosphate-activated glutaminase and can release glutamate (for reviews: Kvamme et al., 2000; Broer and Brookes, 2001; Volterra and Meldolesi, 2005), could have contributed to the restoration by glutamine of the DPDPE-induced glutamate release in animals submitted 2 days before to $L\text{-}\alpha\text{AA}$. Nevertheless, the total abolition of the DPDPE stimulating effect on glutamate release at this post-lesional time supports the hypothesis of a complete (and not partial) destruction of glial cells in the vicinity of the dialysis probe. Furthermore, considering the weak dialysance of the probes (about 10%), the striatal infusion of glutamine at the concentration of 2.5 mM, which is agreement with the basal extracellular levels of glutamine evaluated from other striatal microdialysis studies (Segovia and Mora, 1998; Behrens et al., 2002; Molchanova et al., 2004), produced at the outer face of the dialysis membrane a maximal extracellular concentration inferior to the 400 μM concentration that appears required to induce glutamine uptake into glial cells (Chaudhry et al., 1999). As in physiological conditions glutamine also appears as a major contributor to synaptic GABA release (Bak et al., 2006), the restoration by glutamine of DPDPE-induced effects could also reflect an indirect process involving GABAergic neurones. However, previous experiment showed that the effects of DPDPE on dopamine release persisted despite the striatal injection of kainic acid (Dourmap et al., 1992), ruling out in this respect the involvement of δ -opioid receptors located on intrinsic striatal neurons (such as GABAergic neurons). In addition, we previously demonstrated that DPDPE effects on both glutamate and dopamine striatal releases were totally abolished 2 days after ipsilateral cortical lesion, indicating the involvement of corticostriatal neurons (Billet et al., 2004). The recent *in vivo* study by Wang and Pickel (2001), who reported that the number of δ -opioid receptors on glial cells is very weak and most likely of little significance, is also consistent with this view. When combined, these data therefore rule out the hypothesis of a specific involvement of glial cells in the DPDPE signaling in the striatum. Finally, the results showing that glutamine also restores DPDPE effects on dopamine levels confirm our previous observations indicating that the DPDPE-induced striatal dopamine release requires the presence of functional glutamatergic terminals (Billet et al., 2004). Furthermore, it suggests that the DPDPE-induced increase in extracellular dopamine does not directly involve glial sites.

CONCLUSION

The present study confirms our previous results showing that the stimulation of δ -opioid receptors induces glutamate release in the rat striatum, which, in turn, increases

the release of dopamine. Furthermore, it indicates that the mechanism requires fully-functional astrocytes for lack of which glutamatergic terminals can no longer receive a sufficient supply of glutamine to preserve their ability to release glutamate in response to DPDPE. However, the process by which striatal δ -opioid receptors increase glutamate and dopamine dialysate levels appears not to directly involve glial cells. Moreover, the present investigations show that the gliotoxin $L\text{-}\alpha\text{AA}$ is a useful tool for *in vivo* microdialysis studies attempting to inactivate glial functions. However, the results obtained at later post-injection times must be interpreted with caution because of the consecutive impairment of the glutamatergic transmission.

Acknowledgments—The authors thank Dr. Richard Medeiros, Rouen University Hospital medical editor, for his advice on editing the manuscript.

REFERENCES

- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129–2142.
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98:641–653.
- Baker DA, Xi ZX, Shen H, Swanson CJ, Kalivas PW (2002) The origin and neuronal function of *in vivo* nonsynaptic glutamate. *J Neurosci* 22:9134–9141.
- Bannai S (1986) Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J Biol Chem* 261:2256–2263.
- Behrens PF, Franz P, Woodman B, Lindenberg KS, Landwehrmeyer GB (2002) Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain* 125:1908–1922.
- Benjamin AM, Quastel JH (1972) Locations of amino acids in brain slices from the rat. Tetrodotoxin-sensitive release of amino acids. *Biochem J* 128:631–646.
- Berl S, Clarke DD (1983) The metabolic compartmentation concept. In: Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system (Herts L, Kvamme E, McGeer EG, Shousboe A, eds), pp 205–217. New York: Liss.
- Billet F, Dourmap N, Costentin J (2004) Involvement of corticostriatal glutamatergic terminals in striatal dopamine release elicited by stimulation of delta-opioid receptors. *Eur J Neurosci* 20:2629–2638.
- Bowers MS, Kalivas PW (2003) Forebrain astroglial plasticity is induced following withdrawal from repeated cocaine administration. *Eur J Neurosci* 17:1273–1278.
- Brennan L, Hewage C, Malthouse JP, McBean GJ (2004) Gliotoxins disrupt alanine metabolism and glutathione production in C6 glioma cells: a ^{13}C NMR spectroscopic study. *Neurochem Int* 45:1155–1165.
- Bridges RJ, Hatalski CG, Shim SN, Cummings BJ, Vijayan V, Kundu A, Cotman CW (1992) Gliotoxic actions of excitatory amino acids. *Neuropharmacology* 31:899–907.
- Broer S, Brookes N (2001) Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem* 77:705–719.
- Brown DR, Kretschmar HA (1998) The gliotoxic mechanism of alpha-aminoadipic acid on cultured astrocytes. *J Neurocytol* 27:109–118.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, Copenhagen DR, Edwards RH (1999) Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 99:769–780.

Please cite this article in press as: Billet F, et al., Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal δ -opioid receptors, *Neuroscience* (2007), doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.004

- Cho Y, Bannai S (1990) Uptake of glutamate and cysteine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. *J Neurochem* 55:2091–2097.
- Clark BA, Barbour B (1997) Currents evoked in Bergmann glial cells by parallel fibre stimulation in rat cerebellar slices. *J Physiol* 502 (Pt 2):335–350.
- Dourmap N, Michael-Titus A, Costentin J (1991) Presynaptic modulation of striatal dopamine release by enkephalins. *Adv Biosci* 82:101–102.
- Dourmap N, Michael-Titus A, Costentin J (1992) Differential effect of intrastriatal kainic acid on the modulation of dopamine release by mu- and delta-opioid peptides: a microdialysis study. *J Neurochem* 58:709–713.
- Eriksson PS, Hansson E, Ronnback L (1990) Delta and kappa opiate receptors in primary astroglial cultures from rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 15:1123–1126.
- Fonnum F (1985) Determination of amino acid turnover. *Neuromethods* 3:201–237.
- Giorguieff-Chesselet MF, Besson MJ, Cheramy A, Glowinski J (1979) Role of various amino acids on the modulation of dopamine release from nigro-striatal dopaminergic neurones. *J Physiol* 75: 611–613.
- Glowinski J, Iversen LL (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* 13:655–669.
- Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhatsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomains in neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2:139–143.
- Harris EW (1989) L-Alpha-aminodipate antagonizes the priming effect of quisqualate in hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 161:107–109.
- Hertz L (1979) Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog Neurobiol* 13:277–323.
- Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE (2004) Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci* 24:4551–4559.
- Huck S, Grass F, Hortnagl H (1984) The glutamate analogue alpha-amino adipic acid is taken up by astrocytes before exerting its gliotoxic effect in vitro. *J Neurosci* 4:2650–2657.
- Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8733–8738.
- Kato S, Ishita S, Sugawara K, Mawatari K (1993) Cystine/glutamate antiporter expression in retinal Müller glial cells: implications for DL-alpha-amino adipate toxicity. *Neuroscience* 57:473–482.
- Kato S, Mawatari K, Sugitani K, Yasui Y (1996) DL-alpha-amino adipate is a toxin to Müller cells. *Prog Retin Eye Res* 15:435–454.
- Khurgel M, Koo AC, Ivy GO (1996) Selective ablation of astrocytes by intracerebral injections of alpha-amino adipate. *Glia* 16:351–358.
- Kirschuk S, Kirchhoff F, Matyash V, Kettenmann H, Verkhatsky A (1999) Glutamate-triggered calcium signalling in mouse Bergmann glial cells in situ: role of inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated intracellular calcium release. *Neuroscience* 92:1051–1059.
- Kvamme E, Roberg B, Torgner IA (2000) Phosphate-activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain. *Neurochem Res* 25:1407–1419.
- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhatsky A (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 26:2673–2683.
- Lieth E, LaNoue KF, Berkich DA, Xu B, Ratz M, Taylor C, Hutson SM (2001) Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. *J Neurochem* 76:1712–1723.
- Linsler JP, Moscona AA (1981) Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: its suppression by the gliotoxic agent alpha-amino adipic acid. *Brain Res* 227:103–119.
- Lowry OH, Rosenbourn NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Marcaggi P, Attwell D (2004) Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics. *Glia* 47:217–225.
- Matsui K, Jahr CE, Rubio ME (2005) High-concentration rapid transients of glutamate mediate neural-glia communication via ectopic release. *J Neurosci* 25:7538–7547.
- Matsumoto M, Yoshioka M, Togashi H, Hirokami M, Tochihara M, Ikeda T, Smith CB, Saito H (1994) mu-Opioid receptors modulate noradrenaline release from the rat hippocampus as measured by brain microdialysis. *Brain Res* 636:1–8.
- McBean GJ (1990) Intrastriatal injection of DL-alpha-amino adipate reduces kainate toxicity in vitro. *Neuroscience* 34:225–234.
- McBean GJ (1994) Inhibition of the glutamate transporter and glial enzymes in rat striatum by the gliotoxin, alpha-amino adipate. *Br J Pharmacol* 113:536–540.
- Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130:1007S–1015S.
- Molchanova S, Koobi P, Oja SS, Saransaari P (2004) Interstitial concentrations of amino acids in the rat striatum during global forebrain ischemia and potassium-evoked spreading depression. *Neurochem Res* 29:1519–1527.
- Mosberg HI, Hurst R, Hruby VJ, Gee K, Yamamura HI, Galligan JJ, Burks TF (1983) Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:5871–5874.
- Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT (1990) Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *FASEB J* 4:1624–1633.
- Nakamura Y, Iga K, Shibata T, Shudo M, Kataoka K (1993) Glial plasmalemmal vesicles: a subcellular fraction from rat hippocampal homogenate distinct from synaptosomes. *Glia* 9:48–56.
- Naudon L, Leroux-Nicollet I, Raisman-Vozari R, Botton D, Costentin J (1995) Time-course of modifications elicited by reserpine on the density and mRNA synthesis of the vesicular monoamine transporter, and on the density of the membrane dopamine uptake complex. *Synapse* 21:29–36.
- Nishimura RN, Santos D, Fu ST, Dwyer BE (2000) Induction of cell death by L-alpha-amino adipic acid exposure in cultured rat astrocytes: relationship to protein synthesis. *Neurotoxicology* 21:313–320.
- Olney JW, Degubareff T, Collins JF (1980) Stereospecificity of the gliotoxic anti-neurotoxic actions of alpha-amino adipate. *Neurosci Lett* 19:278–282.
- Olney JW, Ho OL, Rhee V (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* 14:61–76.
- Ottersen OP, Zhang N, Walberg F (1992) Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* 46:519–534.
- Pannicke T, Stabel J, Heinemann U, Reichelt W (1994) alpha-Amino adipic acid blocks the Na(+)-dependent glutamate transport into acutely isolated Müller glial cell from guinea pig retina. *Pflügers Arch* 429:140–142.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744–747.
- Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed. New York: Academic Press.
- Pedersen OO, Karlsen RL (1979) Destruction of Müller cells in the adult rat by intravitreal injection of D,L-alpha-amino adipic acid. An electron microscopic study. *Exp Eye Res* 28:569–575.
- Pow DV (2001) Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to amino adipic acid, a selectively transported substrate. *Glia* 34:27–38.

Please cite this article in press as: Billet F, et al., Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal δ -opioid receptors, *Neuroscience* (2007), doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.004

ARTICLE IN PRESS

F. Billet et al. / Neuroscience xx (2007) xxx

13

- Quock RM, Burkey TH, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K, Cowell SM, Slate CA, Ehler FJ, Roeske WR, Yamamura HI (1999) The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacol Rev* 51:503–532.
- Rae C, Hare N, Bubb WA, McEwan SR, Broer A, McQuillan JA, Balcar VJ, Conigrave AD, Broer S (2003) Inhibition of glutamine transport depletes glutamate and GABA neurotransmitter pools: further evidence for metabolic compartmentation. *J Neurochem* 85:503–514.
- Rothstein JD, Tabakoff B (1984) Alteration of striatal glutamate release after glutamine synthetase inhibition. *J Neurochem* 43:1438–1446.
- Rowe WB, Ronzio RA, Wellner VP, Meister A (1970) Glutamine synthetase (sheep brain). *Methods Enzymol* 17:900–910.
- Ruzicka BB, Fox CA, Thompson RC, Meng F, Watson SJ, Akil H (1995) Primary astroglial cultures derived from several rat brain regions differentially express mu, delta and kappa opioid receptor mRNA. *Brain Res Mol Brain Res* 34:209–220.
- Schad CA, Justice JBJ, Holtzman SG (1996) Differential effects of delta- and mu-opioid receptor antagonists on the amphetamine-induced increase in extracellular dopamine in striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem* 67:2292–2299.
- Segovia G, Mora F (1998) Role of nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. *Brain Res Bull* 45:275–279.
- Seifert G, Rehn L, Weber M, Steinhauser C (1997) AMPA receptor subunits expressed by single astrocytes in the juvenile mouse hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 47:286–294.
- Sibson NR, Mason GF, Shen J, Cline GW, Herskovits AZ, Wall JE, Behar KL, Rothman DL, Shulman RG (2001) In vivo ^{13}C NMR measurement of neurotransmitter glutamate cycling, anaplerosis and TCA cycle flux in rat brain during. *J Neurochem* 76:975–989.
- Slezak M, Priefer FW (2003) New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 26:531–535.
- Szatkowski M, Barbour B, Attwell D (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348:443–446.
- Szerb JC, O'Regan PA (1985) Effect of glutamine on glutamate release from hippocampal slices induced by high K^+ or by electrical stimulation: interaction with different Ca^{2+} concentrations. *J Neurochem* 44:1724–1731.
- Takada M, Hattori T (1986) Fine structural changes in the rat brain after local injections of gliotoxin, alpha-amino adipic acid. *Histol Histopathol* 1:271–275.
- Thorlin T, Eriksson PS, Persson PAI, Aberg ND, Hansson E, Rönnbäck L (1998) Delta-opioid receptors on astroglial cells primary culture: mobilization of intracellular free calcium via a pertussis sensitive G protein. *Neuropharmacology* 37:299–311.
- Timmerman W, Westerink BH (1997) Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* 27:242–261.
- Tsai MJ, Chang YF, Schwarcz R, Brookes N (1996) Characterization of L-alpha-amino adipic acid transport in cultured rat astrocytes. *Brain Res* 741:166–173.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657–661.
- van den Berg C, Garfinkel D (1971) A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem J* 123:211–218.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626–640.
- Waagepetersen HS, Qu H, Sonnewald U, Shimamoto K, Schousboe A (2005) Role of glutamine and neuronal glutamate uptake in glutamate homeostasis and synthesis during vesicular release in cultured glutamatergic neurons. *Neurochem Int* 47:92–102.
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhauser C (2004) Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* 48:36–43.
- Wang H, Pickel VM (2001) Preferential cytoplasmic localization of delta-opioid receptors in rat striatal patches: comparison with plasmalemmal mu-opioid receptors. *J Neurosci* 21:3242–3250.
- Wang JK (1991) Presynaptic glutamate receptors modulate dopamine release from striatal synaptosomes. *J Neurochem* 57:819–822.
- Warr O, Takahashi M, Attwell D (1999) Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *J Physiol* 514:783–793.
- Westerink BH, Hofsteede RM, Tuntler J, De Vries JB (1989) Use of calcium antagonism for the characterization of drug-evoked dopamine release from the brain of conscious rats determined by microdialysis. *J Neurochem* 52:722–729.

(Accepted 2 September 2007)

Please cite this article in press as: Billet F, et al., Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal δ -opioid receptors, *Neuroscience* (2007), doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.004

ÉTUDE NEUROCHIMIQUE ET COMPORTEMENTALE DES MODULATIONS INDUITES PAR LES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DE TYPE δ SUR LES LIBÉRATIONS STRIATALES DE GLUTAMATE ET DE DOPAMINE CHEZ LE RAT

Les enképhalines, ligands endogènes des récepteurs opioïdes δ , sont les neuropeptides les plus abondants du striatum, structure où elles stimulent la libération de dopamine. L'influence des récepteurs δ sur la transmission glutamatergique striatale, principalement supportée par les neurones corticaux, est en revanche méconnue. Néanmoins, des données suggèrent son implication dans la libération de dopamine induite par la DPDPE, agoniste sélectif des récepteurs δ . Nous avons exploré cette hypothèse chez le Rat. Dans ce but, nous avons étudié les effets de la DPDPE sur les taux extracellulaires de dopamine et de glutamate après lésion du cortex ipsilatéral. Nos résultats montrent que la libération striatale de dopamine induite par la DPDPE est la conséquence d'une libération de glutamate par les terminaisons cortico-striatales. Nous avons ensuite recherché une éventuelle contribution des cellules gliales à ce processus. Nos expériences indiquent que, bien qu'essentielles à l'homéostasie du glutamate, les cellules gliales ne participent pas aux effets stimulants de la DPDPE sur les taux de glutamate et de dopamine. Nous avons enfin étudié l'implication comportementale de ces interactions, grâce au modèle des dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat hémiparkinsonien. Nos résultats montrent que les récepteurs δ portés par les terminaisons cortico-striatales sont impliqués dans ces dyskinésies. Nos travaux permettent ainsi d'élargir la connaissance des interactions entre les principaux systèmes de transmission du striatum. Ils confèrent également aux antagonistes des récepteurs δ d'intéressantes perspectives dans l'amélioration du traitement de la maladie de Parkinson.

Mots clés : *récepteurs opioïdes δ ; libération de glutamate ; libération de dopamine ; striatum ; microdialyse ; dyskinésies induites par la L-DOPA.*

NEUROCHEMICAL AND BEHAVIORAL STUDY OF MODULATIONS INDUCED BY δ OPIOÏD RECEPTORS ON GLUTAMATE AND DOPAMINE RELEASE IN THE RAT STRIATUM

Enkephalins, endogenous ligands of δ opioïd receptors, are the most abundant neuropeptides in the striatum, structure in which they stimulate dopamine release. However, the effect of δ opioïd receptors on striatal glutamate, which is mainly released by cortico-striatal neurons, is unknown. Nevertheless, some data suggest its involvement in the dopamine release induced by DPDPE, a δ opioïd selective agonist. This hypothesis was tested in the rat. For this purpose, we studied the effect of DPDPE on extracellular dopamine and glutamate levels in the striatum of animals submitted to an ipsilateral cortical lesion. Our results indicate that the striatal dopamine release induced by DPDPE is a consequence of glutamate release from cortico-striatal terminals. Then, we studied the contribution of glial cells in this process. Our experiments show that, although glial cells are essential to maintain glutamatergic neurotransmission, they are not directly involved in the stimulant effect induced by DPDPE on glutamate and dopamine extracellular levels. At last, we investigated the behavioral significance of these interactions, using the rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. Our results indicate that δ opioïd receptors located on cortico-striatal terminals are involved in dyskinesia. Taken together, our data enhance the knowledge of interactions between the main striatal neurotransmission and neuromodulation systems. They also confer on δ opioïd antagonists interesting properties in the improvement of Parkinson's disease therapy.

Keywords: *δ opioïd receptors; glutamate release; dopamine release; striatum; microdialysis; L-DOPA-induced dyskinesia.*